



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Programa de Doctorado**  
**“Biomedicina y Oncología Molecular”**

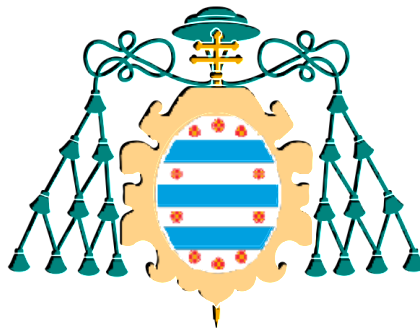
**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS  
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN SARCOMAS BASADAS EN  
EL USO DE INDOLOCARBAZOLES Y DERIVADOS DE LA  
MITRAMICINA**

**TESIS DOCTORAL**

Óscar Rafael Estupiñán Sánchez

10/12/2021





Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## **Tesis Doctoral**

# **DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN SARCOMAS BASADAS EN EL USO DE INDOLOCARBAZOLES Y DERIVADOS DE LA MITRAMICINA**

**Autor**

Óscar Rafael Estupiñán Sánchez

**Directores**

René Rodríguez González

María Matos González

**Tutor:**

César Antonio Álvarez Marcos





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con actividad antitumoral en sarcomas basadas en el uso de indocarbazoles y derivados de la mitramicina	Inglés: Development of new therapeutic strategies with antitumor activity in sarcomas based on the use of indocarbazoles and mithramycin derivatives

2.- Autor	
Nombre: Óscar Rafael Estupiñán Sánchez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo / Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)	

### RESUMEN (en español)

Los sarcomas comprenden un heterogéneo grupo de neoplasias malignas originadas a partir de la transformación neoplásica de células madre mesenquimales y/o de su progenie celular, apareciendo especialmente en tejidos mesodérmicos como son los huesos, el músculo, el cartílago o la grasa. Debido a su elevado potencial metastático y a la frecuente adquisición de resistencia al tratamiento, los sarcomas son generalmente considerados tumores agresivos. Entre los factores que pueden explicar estas características, destaca la presencia de subpoblaciones celulares neoplásicas con fenotipos y funciones comparables a las de las células madre. Estas células, llamadas células madre tumorales, son capaces de autoperpetuarse y se encargan de la propagación y el mantenimiento tumoral.

En términos generales, el tratamiento de los sarcomas se basa en la resección quirúrgica del tumor apoyada, si es procedente, con quimioterapia neoadyuvante (normalmente doxorubicina, ifosfamida, cisplatino o metotrexato) o radioterapia. Si bien los tumores localizados, por lo general, responden bien a la terapia, es recurrente que aparezcan recidivas y/o metástasis con un desarrollo neoplásico mucho más agresivo. A día de hoy, el pronóstico asociado a sarcomas de alto grado es muy desfavorable, algo que ha permanecido inmutable a lo largo de las últimas décadas. En este contexto, el objetivo de esta tesis doctoral, presentada como un compendio de publicaciones, es el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de sarcomas. Con este fin, se han considerado tres estrategias.



- Potencial antitumoral de los inhibidores multiquinasa: EC-70124

Las rutas de señalización molecular asociadas a la actividad quinasa han demostrado tener una gran relevancia en el desarrollo oncológico. Por este motivo, se han dedicado muchos esfuerzos al estudio del potencial antitumoral de diversos compuestos con capacidad de inhibir varias de estas rutas (inhibidores multiquinasa). El EC-70124 es un inhibidor multiquinasa de la familia de los indolocarbazoles derivado a partir de la combinación de las rutas de biosíntesis de la estaurosporina y la rebecamicina. Este compuesto ha demostrado una gran actividad contra diversos tumores, siendo en muchos casos más activo que otros indolocarbazoles aprobados por las agencias de regulación como la midostaurina. En este trabajo se evaluó el potencial anti-tumoral del EC-70124 en sarcomas. Como modelos preclínicos relevantes se emplearon modelos de sarcomagenesis generados a partir de la transformación neoplásica de células madre mesenquimales humanas y líneas primarias derivadas de pacientes.

En comparación con la midostaurina, el EC-70124 demostró una mayor actividad antiproliferativa asociada a una inducción de daño en el ADN incrementada, al bloqueo del ciclo celular en la fase S y a la activación de mecanismos de apoptosis. Además, el EC-70124 demostró una capacidad superior para inhibir la fosforilación de un gran número de dianas estrechamente vinculadas al desarrollo neoplásico en sarcomas, entre las que destacan las asociadas a las rutas PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y SRC. Entre estas rutas de señalización, la inhibición de la señalización mediada por mTOR resultó un mecanismo de acción clave en la actividad antineoplásica del EC-70124. A pesar del potente efecto antitumoral observado *in vitro*, el tratamiento de xenógrafos tumorales de un modelo de liposarcoma mixoide con EC-70124 sólo produjo una reducción parcial del crecimiento tumoral.

Además de la actividad antitumoral del compuesto, se encontró que el EC-70124 es capaz de inhibir la expresión de las bombas ABC en distintos modelos de sarcoma. Estas bombas están encargadas de la expulsión de compuestos potencialmente citotóxicos, estando estrechamente relacionadas con la adquisición de resistencia a quimioterapia en células neoplásicas. Partiendo de estos datos, se consideró la posibilidad de que la inhibición de las bombas ABC mediada por el EC-70124 pudiera sensibilizar las células a otros tratamientos con mayor actividad antitumoral. De esta manera, se establecieron tratamientos combinados de EC-70124 y doxorubicina,



encontrándose que ambos compuestos presentaban un tipo interacción sinérgica con respecto a su potencial antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*.

- Uso de sistemas de nano-distribución para la mejora del índice terapéutico de la mitramicina

La mitramicina es un antibiótico natural de la familia del ácido aureólico que presenta una actividad antitumoral muy elevada. Sin embargo, los severos efectos adversos asociados a este compuesto lo han alejado de la aplicación clínica. Con el fin de mejorar los parámetros de biodistribución la mitramicina en el organismo y, de esta manera, aumentar su ventana terapéutica, se diseñaron una serie de nanovehículos de diferentes naturalezas con capacidad de encapsularla. La encapsulación de la mitramicina, por un lado, persigue aumentar su tiempo de vida medio en el organismo y, por otro, dirigir de manera directa o indirecta su distribución y acumulación en la región neoplásica, reduciendo, de esta manera, la toxicidad sistémica asociada al tratamiento y mejorando su efectividad contra el tumor. Con este fin, se buscó que los sistemas nanotransportadores diseñados cumplieran con una serie de parámetros específicos.

Para empezar, resulta clave que la composición de cada nanopartícula sea completamente inocua y biodegradable en el organismo. Además, el rango de tamaños (radios hidrodinámicos) deseados se estableció alrededor de los 100-200 nm. Este rango favorece que las partículas eludan la acción del sistema inmune y el filtrado renal. Además, las partículas de este tamaño tienden a acumularse en tejidos con una estructura vascular aberrante como los tumores. Por otro lado, se buscó que las partículas mostraran una baja dispersión de tamaños y una alta eficacia de encapsulación. Considerando estos parámetros, se diseñaron tres clases de nanotransportadores. Por un lado, se generaron dos tipos de nanovesículas: i) liposomas (nanopartículas de composición lipídica) generados por evaporación en fase inversa e inyección en etanol; y ii) transfersomas (compuestos por lípidos, surfactantes y colesterol) preparados por hidratación en película fina e inyección en etanol. Por otro lado, se generaron nanopartículas poliméricas: i) a partir de ácido poli láctico y generados por nanoprecipitación; y ii) a partir de ácido poli-lactico-co-glucólico generados por evaporación de disolvente. Por último, se generaron hidrogeles a partir de un compuesto hidrogelante no peptídico derivado de la urea.

Tras la preparación de los diferentes nanovehículos, se realizaron ensayos funcionales



empleando modelos “célula de origen” de sarcoma y líneas primarias derivadas de paciente. Los ensayos *in vitro* evidenciaron que la mitramicina encapsulada en los diferentes nanotransportadores retiene la alta capacidad del fármaco libre para inhibir la proliferación neoplásica, la invasión o el potencial de eliminar las subpoblaciones de células madre tumorales. Además, mediante análisis transcriptómicos de genoma completo y/o la detección de proteínas específicas, se comprobó que tanto la mitramicina libre como encapsulada son capaces de inhibir de forma simultánea múltiples rutas moleculares asociadas al desarrollo tumoral. Entre estas rutas, destaca la inhibición de las dianas reguladas por SP1, un factor de transcripción pleiotrópico y frecuentemente desregulado en cáncer que ha sido descrito como la principal diana de la mitramicina. Finalmente, el tratamiento *in vivo* de xenógrafos tumorales generados con el modelo de liposarcoma mixoide demostró que la mitramicina encapsulada en los liposomas resultó significativamente más efectiva que la libre y, además, presentó una toxicidad sistémica reducida. Estos resultados sugieren que las formulaciones ensayadas pueden representar una alternativa más segura y eficiente para el uso de mitramicina como agente antitumoral en sarcomas.

- Mecanismos moleculares asociados con la actividad contra fenotipos pluripotenciales del análogo de la mitramicina EC-8042: El papel de NOTCH1

El EC-8042 es un compuesto generado a partir de la ruta de biosíntesis de la mitramicina. Compartiendo con este compuesto su principal mecanismo de acción, el EC-8042 mantiene un alto potencial antineoplásico mientras muestra una toxicidad sistémica considerablemente inferior a la mitramicina. Varios estudios han evidenciado que el EC-8042 presenta una alta actividad contra subpoblaciones de células madre tumorales en diversas neoplasias. Partiendo de esta información, en este último estudio se evalúa el potencial del EC-8042 para el tratamiento de osteosarcomas, poniendo especial atención a su actividad contra subpoblaciones de células madre tumorales.

En primer lugar, se analizaron los mecanismos moleculares involucrados en la actividad antineoplásica del EC-8042 mediante un estudio del transcriptoma realizado sobre modelos celulares de liposarcoma mixoide y osteosarcoma. Además, se compararon los perfiles de alteración genética con los observados para la mitramicina en el estudio anterior. Ensayando las concentraciones IC<sub>50</sub> de cada fármaco se observó que el EC-8042 induce un mayor nivel de modulación génica (tanto represión como activación)





que la mitramicina. En este sentido, EC-8042 mostró una mayor capacidad de inhibir dianas asociadas al desarrollo neoplásico, entre las que se pueden destacar VEGFA, TERT, CDH4, SRC, FAK, WNT5 o NOTCH1. Además, hubo un grado significativo de solapamiento entre dianas inhibidas por el EC-8042 en los dos modelos de sarcoma testados, sugiriendo la existencia de mecanismos de acción comunes. Los estudios oncológicos de la señalización alterada mostraron un alto potencial de ambos fármacos para inhibir rutas de señalización asociadas con el cáncer. Aunque muchas de estas rutas fueron comúnmente moduladas por ambos tratamientos, algunas fueron inhibidas de manera específica por el EC-8042. Entre estas rutas de señalización, cabe destacar NOTCH1, la cual se ha descrito que juega un papel clave en la oncogénesis y el mantenimiento de fenotipos pluripotenciales en diversos tumores. En este sentido, se encontró una correlación significativa entre los niveles de expresión nuclear de NOTCH1 y una mayor agresividad tumoral además de una menor supervivencia del paciente. El análisis de los niveles proteicos de distintos componentes de esta ruta en un panel de líneas de osteosarcoma confirmó que EC-8042 es capaz de actuar como un eficiente inhibidor de la ruta NOTCH1 a distintos niveles. Por lo tanto, es posible establecer la hipótesis de que la inhibición de esta ruta de señalización puede jugar un papel trascendental en la actividad antineoplásica del EC-8042. Como herramientas para estudiar el papel de esta ruta se generaron líneas de osteosarcoma con sobreexpresión del dominio intra-citosólico (forma activa) de NOTCH1 (NICD) o con silenciamiento de la expresión de HES1, una de las principales dianas transcripcionales de la ruta. Los ensayos funcionales demostraron que la sobreexpresión de NICD hace más resistentes a las subpoblaciones de células madre tumorales al tratamiento con EC-8042 tanto en ensayos *in vitro* con líneas celulares como *in vivo* con xenógrafos tumorales. Por otro lado, la inhibición de HES1 reduce la proporción de células con fenotipos asociados a las células madre tumorales y provoca una menor tasa de crecimiento tumoral *in vivo*.

En conjunto estos resultados evidencian que la actividad de EC-8042 contra las células madre tumorales depende su capacidad para inhibir la ruta de NOTCH1. Además, el estudio sugiere que el EC-8042 puede constituir un tratamiento eficaz contra los osteosarcomas y otros tipos de tumores donde la señalización mediada por NOTCH1 promueva la aparición de células madre tumorales.



## RESUMEN (en inglés)

Sarcomas comprise a heterogeneous group of malignancies originated from the neoplastic transformation of mesenchymal stem cells and/or their derived progenitor cells. These neoplasms commonly arise in mesodermal tissues such as bones, muscle, cartilage or fat. Due to their high metastatic potential and the frequent acquisition of resistance to current treatments, sarcomas are generally considered aggressive tumors. Among the factors associated with this malignant behavior, it is worth highlighting the presence of neoplastic cells with phenotypes and functions comparable to those of normal stem cells. These so-called “cancer stem cells”, show self-renewal ability and are responsible for the maintenance of tumor homeostasis and its propagation.

In general, the treatment of sarcomas is based on surgical resection of the tumor supported, if necessary, by neoadjuvant chemotherapy (usually doxorubicin, ifosfamide, cisplatin or methotrexate) or radiotherapy. While these tumors usually respond well to standard treatments, many patients develop relapses and/or metastases with increased aggressiveness. Nowadays, the prognosis of high-grade sarcomas is dismally unfavorable, a fact that have remained unchanged over the last decades. In this context, the objective of this thesis, presented as a compendium of papers, is the development of new therapeutic approaches for the treatment of sarcomas. With this aim, three strategies have been considered.

- Antineoplastic potential of multikinase inhibitors: EC-70124

Signaling pathways controlled by receptors and effectors with kinase activity are known to play relevant roles in cancer development. For this reason, many efforts have been devoted to the study of the antitumor potential of various compounds with the ability to inhibit several of these pathways (multikinase inhibitors). EC-70124 is hybrid indolocarbazole analog with multikinase inhibitor activity derived from the combination of the biosynthesis pathways of staurosporin and rebecamycin. This compound has demonstrated a great anti-tumor activity against different types of tumors, being in many cases more active than other indolocarbazoles approved by regulatory agencies, such as midostaurin. In this work, the anti-tumor potential of EC-70124 against sarcomas was evaluated. As relevant preclinical models, cell-of-origin models generated from transformed mesenchymal stem cells and primary cell lines derived from patients were used.



Compared to midostaurin, EC-70124 showed greater antiproliferative activity associated with increased induction of DNA damage, cell cycle arrest in the S phase, and activation of pro-apoptotic mechanisms. In addition, EC-70124 demonstrated a greater ability to inhibit the phosphorylation of a large number of targets closely linked to neoplastic development in sarcomas, being PI3K/AK/mTOR, JAK/STAT and SRC the most relevant pathways affected. Among these signaling pathways, inhibition of mTOR-mediated signaling was shown to play a relevant role in the antineoplastic activity of EC-70124. Despite the potent antitumor effect observed *in vitro*, the treatment of myxoid liposarcoma xenografts only produced a partial reduction of tumor growth.

In addition to its antitumor activity, EC-70124 was able to repress the expression of ABC transporters in different sarcoma models. These pumps are responsible for the efflux of xenobiotic compounds, being closely related to the acquisition of drug resistance by tumor cells. Based on its ability to inhibit ABC efflux activity, it may be speculated that EC-70124 could sensitize tumor cells to other anti-tumor drugs. Therefore, the antitumoral potential of a combined treatment of EC-70124 and doxorubicin was evaluated. Both compounds showed a synergistic interaction that led to a significant increase in antitumoral activity against sarcoma cells both *in vitro* and *in vivo*.

- Use of nano-delivery systems as a way to improve the therapeutic index of mithramycin

Mithramycin is a natural aureolic acid antibiotic that has demonstrated a great antitumoral activity. However, the severe adverse effects associated with this compound have limited its clinical applications. In order to improve the pharmacokinetics of mithramycin and thus increase its therapeutic window, a collection of nanometric carriers with capacity to encapsulate this drug was designed. The encapsulation of mithramycin seeks to increase its half-life in the body and drive, directly or indirectly, its distribution and accumulation in the neoplastic region, thus reducing, the systemic toxicity associated with this drug and improving its efficacy against the tumor. To this end, designed nanocarriers must be optimized for a number of parameters.

First, the composition of each nanoparticle must be completely harmless and



biodegradable in the body. In addition, the optimal size of the nanoparticle (hydrodynamic radii) should be in the range of 100-200 nm, since particles within this range may elude the action of the immune system and renal clearance. Furthermore, particles of this size tend to accumulate in tissues with aberrant vascular structures such as tumors. Optimized nanocarriers should also display a narrow size distribution and a high mithramycin encapsulation efficiency. Considering these parameters, three classes of nanotransporters were designed. On the one hand, two types of nanovesicles were generated: i) liposomes (nanoparticles with a lipidic composition) obtained by reverse phase evaporation and ethanol injection; and ii) transfersomes (composed of lipids, surfactants and cholesterol) prepared by thin film hydration and ethanol injection methods. On the other hand, two types of polymeric nanoparticles were designed: i) from polylactic acid obtained by nanoprecipitation; and ii) from poly-lactic-co-glycolic acid prepared by solvent evaporation. Finally, hydrogels were generated using a non-peptide hydrogelator derived from urea.

Once the different nanocarriers were developed and optimized, we performed functional assays to characterized their ability to target different cell-of-origin sarcoma models and patient-derived primary cell lines. *In vitro* assays showed that all encapsulated mithramycin nanoformulations retain the high capacity of free mithramycin to inhibit neoplastic proliferation, invasion, or the potential to eradicate cancer stem cells subpopulations. In addition, by performing whole-genome transcriptomic analysis and/or the detection of specific proteins, it was evidenced that both, free and encapsulated mithramycin, were capable of simultaneously inhibit multiple molecular pathways associated with tumor development. Among these pathways, it worth highlight those targets regulated by SP1, a pleiotropic transcription factor that is frequently deregulated in cancer and has been described as the main target of mithramycin. Finally, *in vivo* treatment of tumor xenografts generated from a myxoid liposarcoma model showed that mithramycin encapsulated in liposomes was significantly more effective than free mithramycin and presented a reduced systemic toxicity. These results suggest that all assayed nanoformulations may represent a safer and more efficient alternative for the use of mithramycin as an antitumor agent in sarcomas.

- Molecular mechanisms associated to the anti-stemness activity of the mithramycin analog EC-8042: Role of NOTCH1 signaling



The EC-8042 was generated by genetic engineering of the mithramycin biosynthesis pathway. Sharing the main mechanisms of action with this drug, EC-8402 maintains a high antineoplastic potential while exhibiting greatly reduced systemic toxicity compared to mithramycin. Several studies have evidenced the high potential of EC-8042 to eradicate cancer stem cell subpopulations in several tumor types. Bearing in mind this background, the last study of this thesis aimed to evaluate the potential of EC-8042 for the treatment of osteosarcomas, paying a special attention to the molecular mechanisms involved in mediating its anti-stemness activity.

First, a transcriptomic analysis was performed to unravel the molecular mechanisms involved in the antineoplastic activity of the EC-8042 in myxoid liposarcoma and osteosarcoma models. This genomic expression profiles were also compared with those obtained after the treatment of the same models with mithramycin. These analyses showed that, when assayed at their respective  $IC_{50}$  concentrations, EC-8042 induces a higher level of gene modulation (both repression and activation) than mithramycin. Thus, EC-8042 showed a greater potential to inhibit the expression of relevant cancer-associated genes such as VEGFA, TERT, CDH4, SRC, FAK, WNT5 or NOTCH1. In addition, there was a significant degree of overlap between targets inhibited by EC-8042 in both sarcoma models, thus suggesting the existence of common mechanisms of action of this drug in sarcomas. Ontological studies of altered signaling also revealed a high potential of these drugs to inhibit pathways associated with cancer. Although many of these pathways were commonly repressed by both drugs, other signaling routes were specifically modulated by EC-8042. Among this signaling specifically altered by EC-8042, NOTCH1 signaling is known to play oncogenic and pro-stemness roles in many types of tumors. In this sense, the nuclear expression of NOTCH1 in sarcomas was significantly correlated with increased tumor aggressiveness and lower patient survival. Analysis of the protein levels of different components of this pathway in a panel of osteosarcoma cell lines confirmed that EC-8042 is capable of effectively repressing the NOTCH1 pathway at different levels. Therefore, it can be hypothesized that the inhibition of this pathway could play a key role in the antineoplastic activity of EC-8042. As tools to study the role of this pathway, osteosarcoma lines were generated with overexpression of the intra-cytosolic domain (active form) of NOTCH1 (N1ICD) or with silenced expression of HES1, one of the main transcriptional targets of this pathway. Functional assays demonstrated that overexpression of N1ICD renders cancer



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

stem cells subpopulations more resistant to treatment with EC-8042 both in *in vitro* assays with cell lines and *in vivo* using tumor xenografts. On the other hand, the inhibition of HES1 reduces the proportion of cells presenting cancer stem cell-associated phenotypes and resulted in a lower rate of tumor growth *in vivo*.

Together, these results evidence that the activity of EC-8042 against cancer stem cells highly depends on its ability to inhibit NOTCH1 pathway. Moreover, the study suggests that EC-8042 may constitute an effective treatment against osteosarcomas and other neoplasms in which NOTCH1 signaling plays a pro-stemness role.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**



## FORMULARIO RESUMEN DE TESIS POR COMPENDIO

1.- Datos personales solicitante	
Apellidos: Estupiñán Sánchez	Nombre: Óscar Rafael

Curso de inicio de los estudios de doctorado	2016-2017
--	-----------

	SI	NO
Acompaña acreditación por el Director de la Tesis de la aportación significativa del doctorando	X	

**Acompaña memoria que incluye**

Introducción justificativa de la unidad temática y objetivos	X	
Copia completa de los trabajos *	X	
Resultados/discusión y conclusiones	X	
Informe con el factor de impacto de las publicaciones	X	

Se acompaña aceptación de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como tesis por compendio (Art. 32.4.b)	X	
Se acompaña renuncia de todos y cada uno de los coautores no doctores a presentar el trabajo como parte de otra tesis de compendio (Art. 32.4.c)	X	

\* Ha de constar el nombre y adscripción del autor y de todos los coautores así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación por parte de la revista o editorial

FOR-MAT-VOA-033

### Artículos, Capítulos, Trabajos

#### Trabajo, Artículo 1

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

The multikinase inhibitor EC-70124 synergistically increased the antitumor activity of doxorubicin in sarcomas
21/12/2018
05/12/2018
Si
7,360

Coautor2 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Laura Santos Duque
Aída Rodríguez Pérez
Lucía Fernández Nevado
Paula Costales
Judith Pérez Escuredo



Coautor7	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor8	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor9	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor10	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor11	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor12	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor13	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor14	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor15	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor16	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor17	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor18	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos

María Ana Hermosilla
Patricia Oro Carbajosa
Verónica Rey Vázquez
Juan Tornín Cavielles
Eva Allonca Campa
María Teresa Fernández García
Carlos Álvarez Fernández
Alejandro Braña Vigil
Aurora Astudillo González
Sofía Tirados Menéndez
Francisco Morís Varas
René Rodríguez González

**Trabajo, Artículo 2**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Nano-Encapsulation of Mithramycin in Transfersomes and Polymeric Micelles for the Treatment of Sarcomas
25/03/2021
22/03/2021
Si
4,241

Coautor2	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor3	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor4	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor5	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor6	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor7	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor8	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor9	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
Coautor10	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos

Claudia Rendueles Martínez
Paula Rosa Suárez Vaquero
Verónica Rey Vázquez
Dzohara Murillo Cabria
Francisco Morís Varas
Gemma Gutiérrez Cervelló
María del Carmen Blanco López
María Matos González
René Rodríguez González

**Trabajo, Artículo 3**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Mithramycin delivery systems to develop effective therapies in sarcomas. Journal of Nanobiotechnology.
06/09/2021
20/08/2021
SI
10,435

Coautor2	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor	.	Indique nombre y apellidos
----------	--	------------------------------------	---	----------------------------

Enrique Niza González
-----------------------





Coautor3	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor4	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor5	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor6	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor7	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor8	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor9	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor10	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor11	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor12	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor13	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor14	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor15	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor16	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor17	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos

Iván Bravo Pérez
Verónica Rey Vázquez
Juan Tornin Cavielles
Borja Gallego Martínez
Pilar Clemente Casares
Francisco Morís Varas
Alberto Ocaña Fernández
Verónica Blanco Lorenzo
Mar Rodríguez Santamaría
Aitana Vallina Álvarez
María Victoria González Meana
Aída Rodríguez Pérez
Daniel Hermida Merino
Carlos Alonso Moreno
René Rodríguez González

---

En caso de compendio de un número de artículos superior a seis, se incorporarán hojas suplementarias conforme a este modelo



## AGRADECIMIENTOS

Ahora que llega el final de este largo camino, atrás quedan algo más de cinco años en los que, además de muchas horas de duro trabajo, sudor y lágrimas, he puesto a prueba los límites de mi salud mental y, lo que es más grave, he perdido la melena. Se supone que debería decir que no puedo estar más orgulloso de lo que he logrado y aprendido en todo este tiempo, y aunque en parte lo estoy, debo admitir que desde que hace apenas unos meses una pequeña semilla de lino llegó a mi vida, toda mi capacidad de sentir orgullo ha encontrado un nuevo propósito. La primera mención que quiero hacer es hacia ella, Henar, porque al final todo esto es por ti. Si algún día lees la tesis de tu padre, gracias, porque le diste sentido a todo esto.

Sin embargo, sería egoísta decir que he recorrido este camino yo solo, de ser así, nunca lo hubiese conseguido. Solo por lo que me ha aguantado durante todo este proceso, es justo decir que moralmente esta tesis doctoral tiene otra madre. Gracias Iddún, porque caminar a tu lado ha hecho más liviano el camino hasta aquí, porque no me puedo imaginar haber recorrido toda esta aventura, y las que nos quedan por recorrer, de la mano de otra persona.

También quiero agradecer a mis padres Teresa y Rafael y a mi hermana Andrea. Soy un consciente de que soy un privilegiado por tener la oportunidad de haber llegado hasta aquí, y eso es gracias al apoyo incondicional que ustedes siempre me han prestado. Gracias, por darme la confianza para haber hecho esta tesis a sabiendas de que, como científico, su hijo morirá probablemente en la más extrema pobreza.

Además, debo que hacer una mención especial a mis suegros, Elvira y Juan Miguel, que me acogieron enseguida como uno más de la familia demostrándome un apoyo y un cariño abrumadores, siempre acompañados con ingentes cantidades de comida, dicho sea de paso.

Por supuesto, no quiero dejar de mencionar al resto de mi familia. Si no empiezo a mencionarles uno a uno no es por falta de consideración, pero es que somos muchos... muchísimos. Ustedes nunca han dejado de ser partícipes de mis éxitos y mis errores, dándome aliento y haciendo que la distancia que nos ha separado estos años sea únicamente física.

Tampoco puedo dejar de agradecer a mis amigos, muchos de los cuales han transitado por el tedioso camino de la tesis a mi par. Ya saben que no son menos que familia para mí y que, sin ustedes, tampoco hubiese tenido las fuerzas para terminar este proyecto. Pese a

que no siempre he podido compartir con ustedes todas las experiencias que tocaban, ahora que soy “libre” podré compensarlo con creces.

Sería un despropósito no mencionar en estos agradecimientos a mis directores, René y María. René no solo ha sido todo un modelo de cómo debe ser un buen investigador-Además de darme la oportunidad de empezar mi recorrido en esta carrera, siempre ha sido accesible y ha estado dispuesto a escuchar y valorar las propuestas y los problemas de aquellos que estaban a su cargo. Gracias, por apoyarme y orientarme en mi formación como investigador. En cuanto a María, cómo no voy a agradecer a una de las personas que primero me abrió la puerta a investigar, siempre disponible a ayudar en lo que fuese necesario y dándome la oportunidad de realizar mis primeras horas de docencia, el camino que, en última instancia, me gustaría seguir en un futuro cercano.

Por ir finalizando, debo agradecer a todo el grupo de Carcomas. No podía haber encontrado mejores compañeros con los que colaborar, compartir ideas, trabajo y café. Entre ellos, me gustaría agradecer especialmente a mi compañera Verónica, porque siempre está disponible para echar una mano y porque, en la intensidad (y, a veces, hostilidad) del trabajo en el laboratorio, encontrar a alguien capaz de prestarte oído, una sonrisa y palabras de ánimo es trascendental. Además, quería mencionar a mi compañero Juan, porque cuando joven, melencólico e inocente me disponía a comenzar la tesis, me dijo “¿estás seguro de esto? cada año que pases haciendo la tesis, envejecerás cinco”. No podía tener más razón.

Para finalizar, me gustaría agradecer a todos los compañeros que, día a día, trabajan para hacer crecer y seguir creciendo en el difícil camino que es la ciencia, pero que no pierden la perspectiva de que esto, al final, es solo un trabajo, uno especialmente duro y maravilloso. Algún día, los que estamos empezando seremos directores, profesores o gestores, y seremos los responsables de dignificar las condiciones de trabajo en los laboratorios.

A Iddún, Henar y Haizea.

Otra vez, a nuestra extraña manera.

# RESUMEN

---

## RESUMEN

Los sarcomas comprenden un heterogéneo grupo de neoplasias malignas originadas a partir de la transformación neoplásica de células madre mesenquimales y/o de su progenie celular, apareciendo especialmente en tejidos mesodérmicos como son los huesos, el músculo, el cartílago o la grasa. Debido a su elevado potencial metastático y a la frecuente adquisición de resistencia al tratamiento, los sarcomas son generalmente considerados tumores agresivos. Entre los factores que pueden explicar estas características, destaca la presencia de subpoblaciones celulares neoplásicas con fenotipos y funciones comparables a las de las células madre. Estas células, llamadas células madre tumorales, son capaces de autopropagarse y se encargan de la propagación y el mantenimiento tumoral.

En términos generales, el tratamiento de los sarcomas se basa en la resección quirúrgica del tumor apoyada, si es procedente, con quimioterapia neoadyuvante (normalmente doxorubicina, ifosfamida, cisplatino o metotrexato) o radioterapia. Si bien los tumores localizados, por lo general, responden bien a la terapia, es recurrente que aparezcan recidivas y/o metástasis con un desarrollo neoplásico mucho más agresivo. A día de hoy, el pronóstico asociado a sarcomas de alto grado es muy desfavorable, algo que ha permanecido inmutable a lo largo de las últimas décadas. En este contexto, el objetivo de esta tesis doctoral, presentada como un compendio de publicaciones, es el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de sarcomas. Con este fin, se han considerado tres estrategias.

- Potencial antitumoral de los inhibidores multiquinasa: EC-70124

Las rutas de señalización molecular asociadas a la actividad quinasa han demostrado tener una gran relevancia en el desarrollo oncológico. Por este motivo, se han dedicado muchos esfuerzos al estudio del potencial antitumoral de diversos compuestos con capacidad de inhibir varias de estas rutas (inhibidores multiquinasa). El EC-70124 es un inhibidor multiquinasa de la familia de los indolocarbazoles derivado a partir de la combinación de las rutas de biosíntesis de la estaurosporina y la rebecamicina. Este compuesto ha demostrado una gran actividad contra diversos tumores, siendo en muchos casos más activo que otros indolocarbazoles aprobados por las agencias de regulación como la midostaurina. En este trabajo se evaluó el potencial anti-tumoral del EC-70124 en sarcomas. Como modelos preclínicos relevantes se emplearon modelos de sarcomagenesis generados a

partir de la transformación neoplásica de células madre mesenquimales humanas y líneas primarias derivadas de pacientes.

En comparación con la midostaurina, el EC-70124 demostró una mayor actividad antiproliferativa asociada a una inducción de daño en el ADN incrementada, al bloqueo del ciclo celular en la fase S y a la activación de mecanismos de apoptosis. Además, el EC-70124 demostró una capacidad superior para inhibir la fosforilación de un gran número de dianas estrechamente vinculadas al desarrollo neoplásico en sarcomas, entre las que destacan las asociadas a las rutas PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y SRC. Entre estas rutas de señalización, la inhibición de la señalización mediada por mTOR resultó un mecanismo de acción clave en la actividad antineoplásica del EC-70124. A pesar del potente efecto antitumoral observado *in vitro*, el tratamiento de xenógrafos tumorales de un modelo de liposarcoma mixoide con EC-70124 sólo produjo una reducción parcial del crecimiento tumoral.

Además de la actividad antitumoral del compuesto, se encontró que el EC-70124 es capaz de inhibir la expresión de las bombas ABC en distintos modelos de sarcoma. Estas bombas están encargadas de la expulsión de compuestos potencialmente citotóxicos, estando estrechamente relacionadas con la adquisición de resistencia a quimioterapia en células neoplásicas. Partiendo de estos datos, se consideró la posibilidad de que la inhibición de las bombas ABC mediada por el EC-70124 pudiera sensibilizar las células a otros tratamientos con mayor actividad antitumoral. De esta manera, se establecieron tratamientos combinados de EC-70124 y doxorubicina, encontrándose que ambos compuestos presentaban un tipo interacción sinérgica con respecto a su potencial antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*.

- Uso de sistemas de nano-distribución para la mejora del índice terapéutico de la mitramicina

La mitramicina es un antibiótico natural de la familia del ácido aureólico que presenta una actividad antitumoral muy elevada. Sin embargo, los severos efectos adversos asociados a este compuesto lo han alejado de la aplicación clínica. Con el fin de mejorar los parámetros de biodistribución la mitramicina en el organismo y, de esta manera, aumentar su ventana terapéutica, se diseñaron una serie de nanovehículos de diferentes naturalezas con capacidad de encapsularla. La encapsulación de la mitramicina, por un lado, persigue

aumentar su tiempo de vida medio en el organismo y, por otro, dirigir de manera directa o indirecta su distribución y acumulación en la región neoplásica, reduciendo, de esta manera, la toxicidad sistémica asociada al tratamiento y mejorando su efectividad contra el tumor. Con este fin, se buscó que los sistemas nanotransportadores diseñados cumplieran con una serie de parámetros específicos.

Para empezar, resulta clave que la composición de cada nanopartícula sea completamente inocua y biodegradable en el organismo. Además, el rango de tamaños (radios hidrodinámicos) deseados se estableció alrededor de los 100-200 nm. Este rango favorece que las partículas eludan la acción del sistema inmune y el filtrado renal. Además, las partículas de este tamaño tienden a acumularse en tejidos con una estructura vascular aberrante como los tumores. Por otro lado, se buscó que las partículas mostraran una baja dispersión de tamaños y una alta eficacia de encapsulación. Considerando estos parámetros, se diseñaron tres clases de nanotransportadores. Por un lado, se generaron dos tipos de nanovesículas: i) liposomas (nanopartículas de composición lipídica) generados por evaporación en fase reversa e inyección en etanol; y ii) transfersomas (compuestos por lípidos, surfactantes y colesterol) preparados por hidratación en película fina e inyección en etanol. Por otro lado, se generaron nanopartículas poliméricas: i) a partir de ácido poliláctico y generados por nanoprecipitación; y ii) a partir de ácido poli-láctico-co-glucólico generados por evaporación de disolvente. Por último, se generaron hidrogeles a partir de un compuesto hidrogelante no peptídico derivado de la urea.

Tras la preparación de los diferentes nanovehículos, se realizaron ensayos funcionales empleando modelos “célula de origen” de sarcoma y líneas primarias derivadas de paciente. Los ensayos *in vitro* evidenciaron que la mitramicina encapsulada en los diferentes nanotransportadores retiene la alta capacidad del fármaco libre para inhibir la proliferación neoplásica, la invasión o el potencial de eliminar las subpoblaciones de células madre tumorales. Además, mediante análisis transcriptómicos de genoma completo y/o la detección de proteínas específicas, se comprobó que tanto la mitramicina libre como encapsulada son capaces de inhibir de forma simultánea múltiples rutas moleculares asociadas al desarrollo tumoral. Entre estas rutas, destaca la inhibición de las dianas reguladas por SP1, un factor de transcripción pleiotrópico y frecuentemente desregulado en cáncer que ha sido descrito como la principal diana de la mitramicina. Finalmente, el tratamiento *in vivo* de xenógrafos tumorales generados con el modelo de liposarcoma mixoide demostró que la mitramicina encapsulada en los liposomas resultó



significativamente más efectiva que la libre y, además, presentó una toxicidad sistémica reducida. Estos resultados sugieren que las formulaciones ensayadas pueden representar una alternativa más segura y eficiente para el uso de mitramicina como agente antitumoral en sarcomas.

- Mecanismos moleculares asociados con la actividad contra fenotipos pluripotenciales del análogo de la mitramicina EC-8042: El papel de NOTCH1

El EC-8042 es un compuesto generado a partir de la ruta de biosíntesis de la mitramicina. Compartiendo con este compuesto su principal mecanismo de acción, el EC-8042 mantiene un alto potencial antineoplásico mientras muestra una toxicidad sistémica considerablemente inferior a la mitramicina. Varios estudios han evidenciado que el EC-8042 presenta una alta actividad contra subpoblaciones de células madre tumorales en diversas neoplasias. Partiendo de esta información, en este último estudio se evalúa el potencial del EC-8042 para el tratamiento de osteosarcomas, poniendo especial atención a su actividad contra subpoblaciones de células madre tumorales.

En primer lugar, se analizaron los mecanismos moleculares involucrados en la actividad antineoplásica del EC-8042 mediante un estudio del transcriptoma realizado sobre modelos celulares de liposarcoma mixoide y osteosarcoma. Además, se compararon los perfiles de alteración genética con los observados para la mitramicina en el estudio anterior. Ensayando las concentraciones IC<sub>50</sub> de cada fármaco se observó que el EC-8042 induce un mayor nivel de modulación génica (tanto represión como activación) que la mitramicina. En este sentido, EC-8042 mostró una mayor capacidad de inhibir dianas asociadas al desarrollo neoplásico, entre las que se pueden destacar VEGFA, TERT, CDH4, SRC, FAK, WNT5 o NOTCH1. Además, hubo un grado significativo de solapamiento entre dianas inhibidas por el EC-8042 en los dos modelos de sarcoma testados, sugiriendo la existencia de mecanismos de acción comunes. Los estudios ontológicos de la señalización alterada mostraron un alto potencial de ambos fármacos para inhibir rutas de señalización asociadas con el cáncer. Aunque muchas de estas rutas fueron comúnmente moduladas por ambos tratamientos, algunas fueron inhibidas de manera específica por el EC-8042. Entre estas rutas de señalización, cabe destacar NOTCH1, la cual se ha descrito que juega un papel clave en la oncogénesis y el mantenimiento de fenotipos pluripotenciales en diversos tumores. En este sentido, se encontró una correlación significativa entre los niveles de expresión nuclear de NOTCH1 y una mayor agresividad tumoral además de una menor

supervivencia del paciente. El análisis de los niveles proteicos de distintos componentes de esta ruta en un panel de líneas de osteosarcoma confirmó que EC-8042 es capaz de actuar como un eficiente inhibidor de la ruta NOTCH1 a distintos niveles. Por lo tanto, es posible establecer la hipótesis de que la inhibición de esta ruta de señalización puede jugar un papel trascendental en la actividad antineoplásica del EC-8042. Como herramientas para estudiar el papel de esta ruta se generaron líneas de osteosarcoma con sobreexpresión del dominio intra-citosólico (forma activa) de NOTCH1 (N1ICD) o con silenciamiento de la expresión de HES1, una de las principales dianas transcripcionales de la ruta. Los ensayos funcionales demostraron que la sobreexpresión de NICD hace más resistentes a las subpoblaciones de células madre tumorales al tratamiento con EC-8042 tanto en ensayos *in vitro* con líneas celulares como *in vivo* con xenógrafos tumorales. Por otro lado, la inhibición de HES1 reduce la proporción de células con fenotipos asociados a las células madre tumorales y provoca una menor tasa de crecimiento tumoral *in vivo*.

En conjunto estos resultados evidencian que la actividad de EC-8042 contra las células madre tumorales depende su capacidad para inhibir la ruta de NOTCH1. Además, el estudio sugiere que el EC-8042 puede constituir un tratamiento eficaz contra los osteosarcomas y otros tipos de tumores donde la señalización mediada por NOTCH1 promueva la aparición de células madre tumorales.

## ABSTRACT

Sarcomas comprise a heterogeneous group of malignancies originated from the neoplastic transformation of mesenchymal stem cells and/or their derived progenitor cells. These neoplasms commonly arise in mesodermal tissues such as bones, muscle, cartilage or fat. Due to their high metastatic potential and the frequent acquisition of resistance to current treatments, sarcomas are generally considered aggressive tumors. Among the factors associated with this malignant behavior, it is worth highlighting the presence of neoplastic cells with phenotypes and functions comparable to those of normal stem cells. These so-called “cancer stem cells”, show self-renewal ability and are responsible for the maintenance of tumor homeostasis and its propagation.

In general, the treatment of sarcomas is based on surgical resection of the tumor supported, if necessary, by neoadjuvant chemotherapy (usually doxorubicin, ifosfamide, cisplatin or methotrexate) or radiotherapy. While these tumors usually respond well to standard treatments, many patients develop relapses and/or metastases with increased aggressiveness. Nowadays, the prognosis of high-grade sarcomas is dismally unfavorable, a fact that have remained unchanged over the last decades. In this context, the objective of this thesis, presented as a compendium of papers, is the development of new therapeutic approaches for the treatment of sarcomas. With this aim, three strategies have been considered.

- Antineoplastic potential of multikinase inhibitors: EC-70124

Signaling pathways controlled by receptors and effectors with kinase activity are known to play relevant roles in cancer development. For this reason, many efforts have been devoted to the study of the antitumor potential of various compounds with the ability to inhibit several of these pathways (multikinase inhibitors). EC-70124 is hybrid indolocarbazole analog with multikinase inhibitor activity derived from the combination of the biosynthesis pathways of staurosporin and rebecamycin. This compound has demonstrated a great anti-tumor activity against different types of tumors, being in many cases more active than other indolocarbazoles approved by regulatory agencies, such as midostaurin. In this work, the anti-tumor potential of EC-70124 against sarcomas was evaluated. As relevant preclinical models, cell-of-origin models generated from transformed mesenchymal stem cells and primary cell lines derived from patients were used.

Compared to midostaurin, EC-70124 showed greater antiproliferative activity associated with increased induction of DNA damage, cell cycle arrest in the S phase, and activation of pro-apoptotic mechanisms. In addition, EC-70124 demonstrated a greater ability to inhibit the phosphorylation of a large number of targets closely linked to neoplastic development in sarcomas, being PI3K/AK/mTOR, JAK/STAT and SRC the most relevant pathways affected. Among these signaling pathways, inhibition of mTOR-mediated signaling was shown to play a relevant role in the antineoplastic activity of EC-70124. Despite the potent antitumor effect observed *in vitro*, the treatment of myxoid liposarcoma xenografts only produced a partial reduction of tumor growth.

In addition to its antitumor activity, EC-70124 was able to repress the expression of ABC transporters in different sarcoma models. These pumps are responsible for the efflux of xenobiotic compounds, being closely related to the acquisition of drug resistance by tumor cells. Based on its ability to inhibit ABC efflux activity, it may be speculated that EC-70124 could sensitize tumor cells to other anti-tumor drugs. Therefore, the antitumoral potential of a combined treatment of EC-70124 and doxorubicin was evaluated. Both compounds showed a synergistic interaction that led to a significant increase in antitumoral activity against sarcoma cells both *in vitro* and *in vivo*.

- Use of nano-delivery systems as a way to improve the therapeutic index of mithramycin

Mithramycin is a natural aureolic acid antibiotic that has demonstrated a great antitumoral activity. However, the severe adverse effects associated with this compound have limited its clinical applications. In order to improve the pharmacokinetics of mithramycin and thus increase its therapeutic window, a collection of nanometric carriers with capacity to encapsulate this drug was designed. The encapsulation of mithramycin seeks to increase its half-life in the body and drive, directly or indirectly, its distribution and accumulation in the neoplastic region, thus reducing, the systemic toxicity associated with this drug and improving its efficacy against the tumor. To this end, designed nanocarriers must be optimized for a number of parameters.

First, the composition of each nanoparticle must be completely harmless and biodegradable in the body. In addition, the optimal size of the nanoparticle (hydrodynamic radii) should be in the range of 100-200 nm, since particles within this range may elude the action of the

immune system and renal clearance. Furthermore, particles of this size tend to accumulate in tissues with aberrant vascular structures such as tumors. Optimized nanocarriers should also display a narrow size distribution and a high mithramycin encapsulation efficiency. Considering these parameters, three classes of nanotransporters were designed. On the one hand, two types of nanovesicles were generated: i) liposomes (nanoparticles with a lipidic composition) obtained by reverse phase evaporation and ethanol injection; and ii) transfersomes (composed of lipids, surfactants and cholesterol) prepared by thin film hydration and ethanol injection methods. On the other hand, two types of polymeric nanoparticles were designed: i) from polylactic acid obtained by nanoprecipitation; and ii) from poly-lactic-co-glycolic acid prepared by solvent evaporation. Finally, hydrogels were generated using a non-peptide hydrogelator derived from urea.

Once the different nanocarriers were developed and optimized, we performed functional assays to characterize their ability to target different cell-of-origin sarcoma models and patient-derived primary cell lines. *In vitro* assays showed that all encapsulated mithramycin nanoformulations retain the high capacity of free mithramycin to inhibit neoplastic proliferation, invasion, or the potential to eradicate cancer stem cells subpopulations. In addition, by performing whole-genome transcriptomic analysis and/or the detection of specific proteins, it was evidenced that both, free and encapsulated mithramycin, were capable of simultaneously inhibit multiple molecular pathways associated with tumor development. Among these pathways, it is worth highlighting those targets regulated by SP1, a pleiotropic transcription factor that is frequently deregulated in cancer and has been described as the main target of mithramycin. Finally, *in vivo* treatment of tumor xenografts generated from a myxoid liposarcoma model showed that mithramycin encapsulated in liposomes was significantly more effective than free mithramycin and presented a reduced systemic toxicity. These results suggest that all assayed nanoformulations may represent a safer and more efficient alternative for the use of mithramycin as an antitumor agent in sarcomas.

- Molecular mechanisms associated to the anti-stemness activity of the mithramycin analog EC-8042: Role of NOTCH1 signaling

The EC-8042 was generated by genetic engineering of the mithramycin biosynthesis pathway. Sharing the main mechanisms of action with this drug, EC-8402 maintains a high antineoplastic potential while exhibiting greatly reduced systemic toxicity compared to

mithramycin. Several studies have evidenced the high potential of EC-8042 to eradicate cancer stem cell subpopulations in several tumor types. Bearing in mind this background, the last study of this thesis aimed to evaluate the potential of EC-8042 for the treatment of osteosarcomas, paying a special attention to the molecular mechanisms involved in mediating its anti-stemness activity.

First, a transcriptomic analysis was performed to unravel the molecular mechanisms involved in the antineoplastic activity of the EC-8042 in myxoid liposarcoma and osteosarcoma models. This genomic expression profiles were also compared with those obtained after the treatment of the same models with mithramycin. These analyses showed that, when assayed at their respective IC<sub>50</sub> concentrations, EC-8042 induces a higher level of gene modulation (both repression and activation) than mithramycin. Thus, EC-8042 showed a greater potential to inhibit the expression of relevant cancer-associated genes such as VEGFA, TERT, CDH4, SRC, FAK, WNT5 or NOTCH1. In addition, there was a significant degree of overlap between targets inhibited by EC-8042 in both sarcoma models, thus suggesting the existence of common mechanisms of action of this drug in sarcomas. Ontological studies of altered signaling also revealed a high potential of these drugs to inhibit pathways associated with cancer. Although many of these pathways were commonly repressed by both drugs, other signaling routes were specifically modulated by EC-8042. Among this signaling specifically altered by EC-8042, NOTCH1 signaling is known to play oncogenic and pro-stemness roles in many types of tumors. In this sense, the nuclear expression of NOTCH1 in sarcomas was significantly correlated with increased tumor aggressiveness and lower patient survival. Analysis of the protein levels of different components of this pathway in a panel of osteosarcoma cell lines confirmed that EC-8042 is capable of effectively repressing the NOTCH1 pathway at different levels. Therefore, it can be hypothesized that the inhibition of this pathway could play a key role in the antineoplastic activity of EC-8042. As tools to study the role of this pathway, osteosarcoma lines were generated with overexpression of the intra-cytosolic domain (active form) of NOTCH1 (N1ICD) or with silenced expression of HES1, one of the main transcriptional targets of this pathway. Functional assays demonstrated that overexpression of N1ICD renders cancer stem cells subpopulations more resistant to treatment with EC-8042 both in *in vitro* assays with cell lines and *in vivo* using tumor xenografts. On the other hand, the inhibition of HES1 reduces the proportion of cells presenting cancer stem cell-associated phenotypes and resulted in a lower rate of tumor growth *in vivo*.

Together, these results evidence that the activity of EC-8042 against cancer stem cells highly depends on its ability to inhibit NOTCH1 pathway. Moreover, the study suggests that EC-8042 may constitute an effective treatment against osteosarcomas and other neoplasms in which NOTCH1 signaling plays a pro-stemness role.

# TABLA DE CONTENIDOS

---



# TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO I: ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Cáncer .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Impacto social y estadísticas .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Biología del cáncer .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1. Desarrollo del fenotipo tumoral: La célula de origen .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2. Mantenimiento y propagación: Células madre tumorales .....</b>	<b>5</b>
1.2.2.1. Aislamiento de subpoblaciones CSCs .....	7
1.2.2.2. Factores de transcripción asociados al fenotipo pluripotente .....	10
1.2.2.3. Rutas de señalización implicadas en el fenotipo CSC .....	11
<b>1.2.3. Metástasis .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Tratamiento del Cáncer .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1. Terapias empleadas en clínica .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2. Mecanismos de resistencia a los tratamientos antitumorales .....</b>	<b>26</b>
1.3.2.1. Mecanismos de resistencia globales .....	26
1.3.2.2. Resistencia asociada a CSCs .....	28
<b>2. Sarcomas .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Origen y desarrollo del sarcoma .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1.1. Células madre mesenquimales .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.2. CSCs en sarcomas .....</b>	<b>34</b>
2.1.2.1. Señalización CSCs .....	34
2.1.2.2. Marcadores CSCs en sarcomas .....	35
<b>2.1.3. Metástasis e invasión .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.4. Microambiente tumoral .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. Clasificación de los sarcomas .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2.1. Sarcomas primarios de hueso .....</b>	<b>42</b>
2.2.1.1. Osteosarcoma .....	42
2.2.1.2. Condrosarcoma .....	44
2.2.1.3. Sarcoma de Ewing .....	45
<b>2.2.2. Sarcomas de tejido blando .....</b>	<b>46</b>
2.2.2.1. Liposarcoma .....	47
2.2.2.2. Sarcoma pleomórfico no diferenciado .....	49
2.2.2.3. Sarcoma sinovial .....	50
2.2.2.4. Leiomiomasarcoma .....	51

2.2.2.5. Rbdomiosarcoma .....	51
2.2.3. Otras clasificaciones de los sarcomas .....	52
2.3. Tratamiento de los sarcomas .....	53
2.3.1. Terapias establecidas.....	54
2.3.2. Terapias en desarrollo.....	55
<b>3. Estrategias terapéuticas en sarcomas.....</b>	<b>59</b>
3.1. Inhibidores multiquinasas.....	59
3.1.1. El EC-70124 .....	61
3.2. Nanotransportadores: Encapsulación de agentes citotóxicos.....	62
3.2.1. Claves para la administración mejorada de fármacos.....	64
3.2.1.1. Control pasivo de la biodistribución: Efecto EPR.....	66
3.2.1.2. Control activo de la biodistribución: Funcionalización.....	68
3.2.2. Tipos de nanotransportadores.....	69
3.2.2.1. Nanovesículas .....	69
3.2.2.2. Nanopartículas poliméricas .....	71
3.2.2.3. Hidrogeles.....	74
3.3. Mitramicina y mitrálogos.....	75
3.3.1. Análogos de la mitramicina: El E-8042.....	77
<b>4. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>82</b>
<b>1. Diseño y preparación del tratamiento.....</b>	<b>83</b>
1.1. Agentes citotóxicos.....	83
1.2. Ingeniería de nanomateriales.....	84
1.2.1. Preparación de nanovesículas .....	84
1.2.1.1. Vesículas liposomales unilamelares pequeñas .....	84
1.2.1.2. Transfersomas.....	84
1.2.2. Síntesis de nanopartículas poliméricas.....	85
1.2.2.1. Nanopartículas de Poli(rac-lactida) .....	85
1.2.2.2. Micelas de Poli(lactida-co-ácido glicólico).....	86
1.2.3. Gelificación: Preparación de hidrogeles.....	87
1.2.4. Caracterización de nanotransportadores.....	87
1.2.4.1. Morfología .....	87
1.2.4.2. Estructura.....	88

1.2.4.3. Eficacia de encapsulación y carga .....	88
<b>2. Ensayos de biología celular <i>in vitro</i> .....</b>	<b>90</b>
<b>2.1. Bases del cultivo celular .....</b>	<b>90</b>
2.1.1. Líneas celulares.....	90
2.1.2. Cultivo celular: Rutinas generales .....	92
2.1.3. Cultivo de esferas clonales .....	93
2.1.4. Establecimiento de líneas primarias .....	94
2.1.5. Modificación de líneas celulares.....	95
2.1.5.1. Plásmidos.....	95
2.1.5.2. Amplificación del plásmido.....	95
2.1.5.3. Conservación del cultivo bacteriano.....	96
2.1.5.4. Extracción del ADN amplificado .....	97
2.1.5.5. Transfección transitoria .....	97
2.1.5.6. Modificación genética mediante infección con partículas lentivirales.....	97
<b>2.2. Ensayos sobre cultivos celulares .....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.1. Ensayos de viabilidad celular .....</b>	<b>99</b>
2.2.1.1. Ensayo WST-1.....	99
2.2.1.2. Capacidad de formación de colonias .....	100
2.2.1.3. Proliferación a tiempo real.....	100
2.2.1.4. Sinergia en tratamientos combinados .....	101
<b>2.2.2. Ensayos de toxicidad en esferas clonales .....</b>	<b>102</b>
<b>2.2.3. Ensayos de invasión de esferoides en tres dimensiones.....</b>	<b>103</b>
<b>2.2.4. Detección de GFP por citometría de flujo .....</b>	<b>103</b>
<b>2.2.5. Análisis de integración de nanopartículas.....</b>	<b>104</b>
<b>2.2.6. Análisis del ciclo celular .....</b>	<b>104</b>
<b>2.2.7. Daño a nivel genómico: Inmunofluorescencia .....</b>	<b>105</b>
<b>2.2.8. Interacción con las bombas ABC .....</b>	<b>105</b>
2.2.8.1. Sustrato de ABCB1/MDR1 y ABCG2/BCRP1 .....	106
2.2.8.2. Inhibición de ABCB1/MDR1 y ABCG2/BCRP1.....	107
<b>3. Experimentos de crecimiento tumoral <i>in vivo</i> y análisis histológicos .....</b>	<b>108</b>
<b>3.1. Inoculación y tratamiento de tumores en modelos animales .....</b>	<b>108</b>
<b>3.2. Análisis histológico.....</b>	<b>110</b>
3.2.1. Preparación de los cortes .....	110

3.2.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	110
3.2.3. Inmunohistoquímica.....	111
<b>4. Ensayos bioquímicos .....</b>	<b>113</b>
4.1. Análisis de proteínas.....	113
4.1.1. Cuantificación de proteínas.....	113
4.1.2. Western Blot.....	113
4.1.3. Matriz de anticuerpos .....	117
4.1.4. Afinidad de unión al receptor.....	117
4.2. Análisis de expresión de ARN.....	117
4.2.1. RT-qPCR.....	117
4.2.2. RNAseq.....	119
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>120</b>
<b>1. Resumen de los resultados.....</b>	<b>121</b>
1.1. <b>Artículo 1:</b> El inhibidor multiquinasa EC-70124 incrementa sinérgicamente la actividad antitumoral de la doxorubicina en sarcomas.....	121
1.2. <b>Artículo 2:</b> Nanoencapsulación de mitramicina en transfersomas y micelas poliméricas para el tratamiento de sarcomas .....	123
1.3. <b>Artículo 3:</b> Sistemas de distribución de mitramicina para el desarrollo de terapias efectivas en sarcomas.....	124
1.4. <b>Artículo 4:</b> El mitralgo EC-8042 elimina las poblaciones CSCs en osteosarcomas mediante la inhibición de la ruta de NOTCH .....	126
<b>2. Compendio de artículos .....</b>	<b>128</b>
2.1. <b>Objetivo 1:</b> Estudio del potencial antitumoral del inhibidor multiquinasa de la familia de los indocarbazoles EC-70124 para el tratamiento de sarcomas .....	128
2.1.1. <b>Artículo I:</b> The multi-kinase inhibitor EC-70124 synergistically increase the anti-tumor activity of doxorubicin in sarcomas .....	129
2.2 <b>Objetivo 2:</b> Encapsulación del agente antineoplásico mitramicina en anotransportadores para la mejora de su ventana terapéutica en el tratamiento de sarcomas.....	177
2.2.1. <b>Artículo 2:</b> Nanoencapsulation of mithramycin in transfersomes and polymeric micells for the treatment of sarcomas .....	178
2.2.1. <b>Artículo 3:</b> Mithramycin delviery systems to develop effective therapies in sarcomas.....	204
2.3 <b>Objetivo 3:</b> Estudio de la capacidad del mitralgo EC-8042 para erradicar las subpoblaciones de células madre tumorales en osteosarcomas. ....	245

2.3.1. Artículo 4: The anti-stemness activirt of the mithramycin analog EC-8042 in osteosarcoma is mediated by its activity as multi-target inhibitor of NOTCH1 signalling.....	246
<b>3. Discusión general y consideraciones futuras .....</b>	<b>276</b>
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES.....</b>	<b>282</b>
1. Conclusiones.....	283
2. Conclusions .....	285
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>287</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>293</b>

# **CAPÍTULO I: ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

# Antecedentes, hipótesis y objetivos

## 1. Cáncer

En términos generales, se puede definir el cáncer como el conjunto de afecciones provocadas por la proliferación descontrolada de un grupo de células en el organismo. Lejos de hacer referencia a una única enfermedad, la palabra “cáncer” abarca una gran variedad de patologías que presentan como denominador común un crecimiento celular aberrante, y de las cuales se derivan diversas manifestaciones clínicas, pronósticos y tratamientos.

La masa celular originada por el crecimiento anormal de las células, lo que se conoce como tumor, no siempre presenta un pronóstico maligno. Los llamados tumores benignos son comunes en la población y muchas veces perduran en el organismo sin ser detectados. Cuando el tumor es maligno pueden aparecer metástasis, es decir, el crecimiento de nuevos tumores en tejidos diferentes al afectado originalmente, producidas por células tumorales que se han diseminado e invadido dichos tejidos.

### 1.1. Impacto social y estadísticas

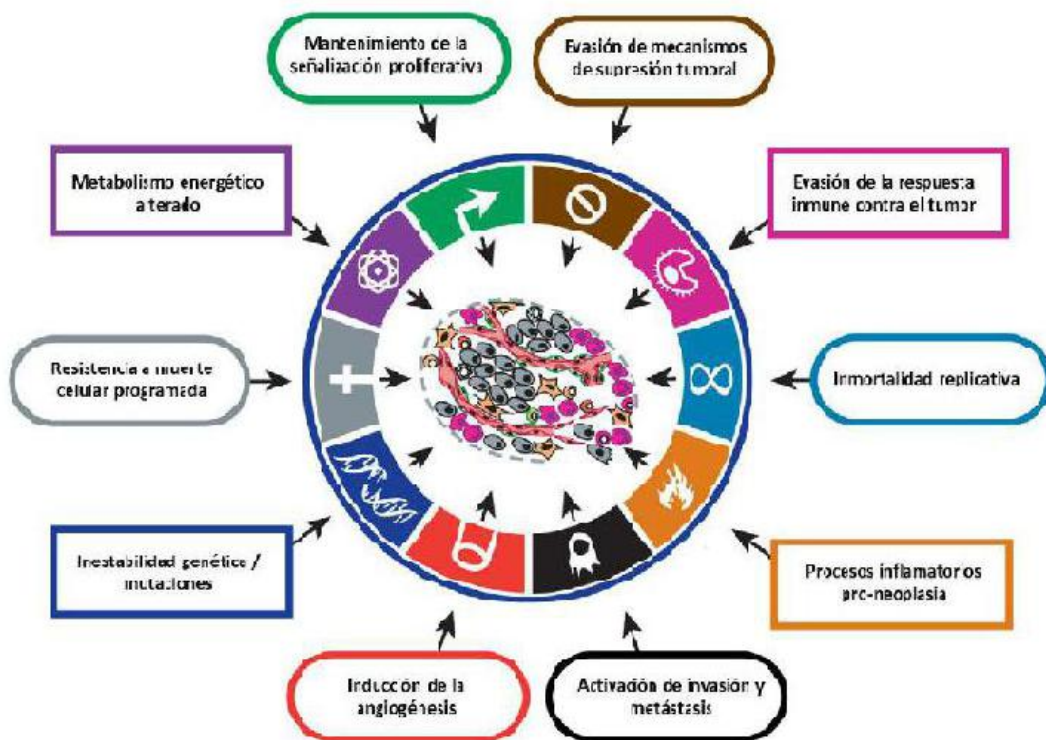
A lo largo de la historia, son múltiples las referencias a patologías cuya manifestación es atribuible a procesos tumorales. Es posible encontrar algunos de estos ejemplos en la Grecia clásica o en el antiguo Egipto, donde textos como el “*Corpus Hipocraticum*”, atribuido a Hipócrates, o los papiros de Ebers o de Kahum ya describen el crecimiento de masas tumorales en pacientes [1, 2]. Curiosamente, la evidencia más temprana de un homínido con un carcinoma data de hace 1,7 millones de años, un osteosarcoma identificado en los restos de un antecesor localizado en las cuevas de Swartkrans, Sudáfrica [3].

A pesar de la relevancia histórica de este tipo de patologías, el cáncer ha cobrado una gran trascendencia en las últimas décadas. Desde los años 90, compite con las enfermedades cardiovasculares para convertirse en la primera causa de muerte en menores de 70 años a nivel global [4, 5]. Según los datos recopilados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) en su informe GLOBOCAN de 2018, se estimaron 18,1 millones de nuevos diagnósticos y 9,8 millones de defunciones relacionadas con cáncer, siendo las neoplasias de pulmón, mama y colorrectales las que mayor incidencia presentaban [5]. Entre los múltiples factores que explican estos datos,

destacan el aumento de la esperanza de vida de la población, así como la mayor exposición a factores de riesgo relacionados con el desarrollo sociocultural de la sociedad [5]. A pesar de lo expuesto, resulta importante mencionar que la ratio de mortalidad por pacientes diagnosticados con cáncer ha ido disminuyendo desde el año 1991 con una caída aproximada del 29% desde ese año [4]. Además, se debe tener en cuenta que aproximadamente una tercera parte de las neoplasias malignas podrían evitarse eliminando los factores de riesgo asociados al ambiente y estilo de vida como son: la obesidad, la contaminación ambiental, la continua exposición a agentes tóxicos durante el periodo laboral, la radiación ultravioleta, el tabaquismo, el sedentarismo o las infecciones [5-8].

## 1.2. Biología del cáncer

Si bien el riesgo a desarrollar procesos carcinogénicos es algo inherente a prácticamente cualquier organismo multicelular, la exposición a los factores de riesgo antes mencionados provoca que los ratios de incidencia en humanos superen de manera significativa a la gran mayoría de especies [10].



**Figura 1:** Esquema resumen de los mecanismos celulares y moleculares cuya alteración está asociada a la aparición de tumores. **Fuente:** Hanahan D. y Weinberg R.A. 2011 [9]



Para facilitar un marco teórico que ayudase a comprender el cáncer en toda su complejidad, se han definido una serie de características comunes en las patologías asociadas a este concepto [9]. En la **Figura 1** se muestra un esquema con las dichas características. A lo largo de este capítulo, se profundizará en los elementos clave que definirán el desarrollo neoplásico y darán origen a las mencionadas características.

### **1.2.1. Desarrollo del fenotipo tumoral: La célula de origen**

Cuando se hace referencia a los llamados hitos o procesos oncogénicos, es importante tener en cuenta los múltiples factores que pueden intervenir en el inicio de un tumor. Estos factores suelen estar relacionados con la acumulación de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas en la célula que acabará originando el tumor. A nivel genético, estas modificaciones pueden provenir de las mutaciones aleatorias producidas por errores acaecidos durante la replicación en el ADN en la división celular [11]. Con menor probabilidad existen otras modificaciones a mayor escala como pueden ser reorganizaciones o repeticiones cromosómicas [12]. Por otro lado, resultan muy relevantes los errores durante la copia de las marcas epigenéticas cuando acaban perpetuándose en la progenie celular [13]. Como muestra, resulta común encontrar altos niveles de metilación de histonas asociadas a la regulación de dianas oncosupresoras en gran variedad de neoplasias malignas [14].

Pese a que las mutaciones son recurrentes siempre que una célula se divide, suelen resolverse mediante mecanismos de reparación genómico, o bien localizarse en regiones de poca relevancia dentro del genoma. Sin embargo, existe una baja probabilidad de que estas alteraciones no sean reparadas y afecten a una región funcional del ADN provocando una alteración significativa en el fenotipo celular. La oncogénesis requiere de la adquisición por parte de la célula originaria del tumor, de una serie de alteraciones clave, o hitos oncológicos, que conduzcan a su desarrollo (**Figura 1**) [9, 15]. El número o localización necesarias para que estos eventos oncológicos conduzcan a un desarrollo neoplásico resulta muy variable, dependiendo en gran medida del microambiente y contexto en el que se sitúe la célula que sufre las alteraciones [15]. En relación a esto, el fenotipo tumoral de origen puede adquirirse mediante un modelo gradualista, definido por la acumulación gradual de alteraciones oncogénicas; o un modelo puntual resultado de un gran evento oncogénico [15].

Partiendo de lo expuesto, un hito oncogénico debe producir un cambio fenotípico en la célula que le resulte favorable en el microentorno en el que se encuentra, de manera que se establece

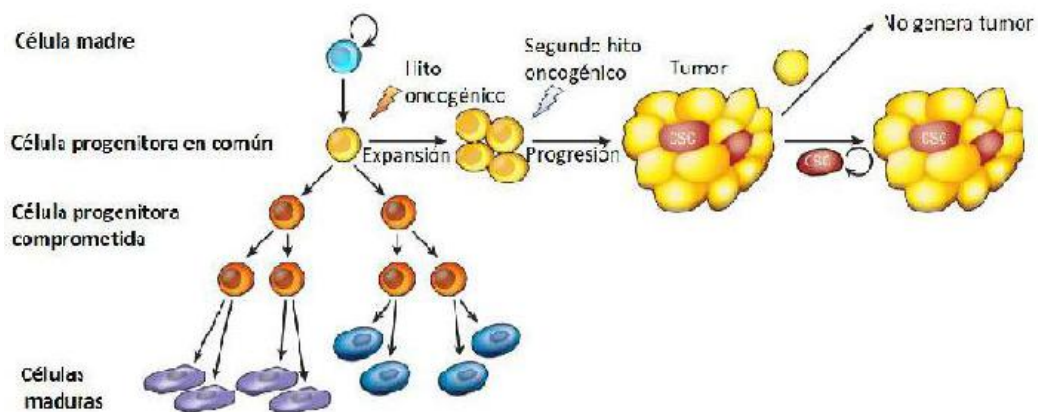
una suerte de selección darwiniana en la que la célula alterada prevalezca en su crecimiento con respecto a las células de su entorno [10, 15, 16]. Esta presión adaptativa, favorecida por la alta actividad proliferativa del tumor [17], resultará muy relevante a lo largo de todo el desarrollo neoplásico. Por consiguiente, la arquitectura tumoral, el acceso diferencial a oxígeno, a nutrientes o a la señalización del nicho extracelular pueden inducir la aparición de variaciones fenotípicas dentro de un mismo tumor, así como de metástasis [15, 18].

La célula que sufre la serie de alteraciones que acabarán conduciendo a un fenotipo tumoral y, por consiguiente, iniciará el tumor, es conocida como célula de origen [19]. Su alta longevidad y su capacidad para autorrenovarse, permitiendo una mayor acumulación de alteraciones, convierte a las células madre de los distintos tejidos en candidatas muy adecuadas para convertirse en células de origen. Sin embargo, cualquier célula es susceptible de ser iniciadora de un tumor mediante la adquisición, a través de mutaciones, de las capacidades asociadas al proceso neoplásico [17]. La identidad de la célula de origen definirá en gran medida la naturaleza del cáncer, así como sus requerimientos para proliferar y diseminarse, siendo, en muchos casos, tan determinante como las propias alteraciones mutacionales sufridas [14]. En este contexto, los diferentes subtipos tumorales que se pueden dar en un tejido, están en gran medida determinados por las características morfológicas, el perfil molecular y la expresión de marcadores específicos en la célula de origen [17]. Esto también se aplica al grado de diferenciación de la célula de origen, que influirá de modo determinante en el grado del tumor. Fenotipos menos diferenciados generarán con mayor probabilidad un desarrollo neoplásico más agresivo [20].

### **1.2.2. Mantenimiento y propagación: Células madre tumorales**

Una vez iniciada la oncogénesis, el mantenimiento del tumor depende, en gran medida, de que las alteraciones sufridas por las células neoplásicas así como las interacciones de señalización en el entorno oncológico, desemboquen en la formación de una subpoblación con un fenotipo del tipo “célula madre” con capacidad de autorrenovación [21]. Partiendo de esta afirmación, cabe definir el concepto de Célula Madre Tumoral (CSCs, por sus siglas en inglés), células con capacidad de autoperpetuarse y que se ocupan de la propagación y mantenimiento del tumor. Las características de estas subpoblaciones define, en última instancia, el nivel de malignidad de la neoplasia [17].

Resulta esencial no confundir los términos CSCs y célula de origen. Si bien una célula madre sana puede acabar transformándose en una célula de origen con mayor probabilidad, cualquier célula puede acabar originando un tumor independientemente de su nivel de diferenciación. En cualquier caso, una vez iniciado el crecimiento neoplásico, los tumores comienzan a adquirir heterogeneidad celular de forma que una subpoblación de células puede adquirir propiedades de CSCs. En la **Figura 2** se puede observar un esquema que explica las principales diferencias entre ambos conceptos.



**Figura 2:** Relación entre la célula de origen y la CSCs. La célula de origen puede ser un precursor más o menos temprano de las células somáticas. La acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas durante el progreso neoplásico puede conducir a la aparición de células tumorales con fenotipo CSCs. **Fuente:** Modificación de Visvader et al, 2011 [17]

Las CSCs tienen muchas propiedades en común con las células madre normales: presentan un elevado potencial replicativo, capacidad de autorrenovación, son capaces de diferenciarse y generar una progenie celular heterogénea de células especializadas (reconstruir completamente la heterogeneidad y jerarquía intratumoral), pueden migrar a nuevas regiones tisulares donde continuar la proliferación celular (invasión y metástasis) y, además, se encargan de mantener la homeostasis tisular (supervivencia tumoral y resistencia) [18, 21, 22]. Si bien su capacidad autorrenovación depende de un proceso de división celular simétrica, las CSCs también pueden llevar a cabo un proceso de división asimétrica en el que se produce una segregación y herencia diferencial en los componentes de la célula progenitora, es decir, se genera una progenie diversificada. Cuando ambos tipos de división celular están balanceados, se observa mayor heterogeneidad dentro del tumor y, en contraste, cuando este balance se rompe a favor de la división simétrica, la cantidad de CSCs se expande aumentando la agresividad del tumor [14]. Este proceso está controlado en gran

medida por la proteína de unión homóloga de Mushashi, cuya expresión se asocia a un mal pronóstico en muchos tumores [23].

#### **1.2.2.1. Aislamiento de subpoblaciones CSCs**

El estudio y caracterización de las CSCs resulta trascendental para alcanzar una mayor comprensión de la evolución tumoral y desarrollar terapias específicas contra estas. Para ello, es necesario llevar a cabo metodologías que permitan identificar y aislar estas células.

Pese a que aún no se han identificado dianas exclusivamente asociadas a las CSCs completamente ausentes en células madre sanas [18], la expresión diferencial de biomarcadores y/o la adquisición de distintas características fenotípicas relacionadas con fenotipos pluripotenciales han servido para desarrollar distintas técnicas de identificación y aislamiento de CSCs en muestras oncológicas. En este apartado se detallarán los principales aspectos tenidos en cuenta a la hora de llevar a cabo dichos procesos.

**Marcadores moleculares:** Como se ha comentado, existen dianas cuyos niveles de expresión están asociados a fenotipos pluripotentes. De esta manera, se pueden marcar subpoblaciones celulares que presenten este tipo de dianas para su posterior aislamiento. Asimismo, sus patrones de expresión, en muchos casos, son poco conocidos; pudiendo presentar grandes variaciones entre subtipos tumorales histológicamente parecidos.

Los biomarcadores más comúnmente empleados se localizan en la membrana celular, dado que su marcaje resulta más sencillo. En la **Tabla 1** se muestran ejemplos de biomarcadores de superficie en diferentes tumores. Sin embargo, también está extendido el uso de biomarcadores intracelulares para la separación de subpoblaciones CSCs. Para ello, resulta necesario emplear células modificadas con construcciones reporteras que permitan vincular la expresión o la actividad de dichos biomarcadores a algún elemento de señalización. Algunos ejemplos de biomarcadores intracelulares empleados para la separación de CSCs son Sox-2, Oct4, Nanog o nestina, los cuales han sido empleados para la separación en diferentes clases de sarcoma [24]. Otros estudios han empleado nestina o isotipos de integrinas para la separación de CSCs en cáncer de mama, páncreas y próstata [25].

**Tabla 1:** Marcadores de superficie asociados a fenotipos CSC. **Fuente:** Recopilación [22, 24-31]

Cáncer	Marcador
Mama	CD29, CD49f, CD44, CD24, CD133, CD90
Ovario	CD44, CD177, CD24, CD133, EpCAM
Colon	CD44, CD24, CD26, CD29, CD133, CD166, EpCAM, ABCB5, Lgr5
Cerebro	CD90, CD133, CD15, CD49f, CD44, CD36, EGFR, A2B5, L1CAM
Estómago	CD44, CD44V8-10, CD133, CD24, CD54, CD90, CD49f, CD71, EpCAM
Colorrectal	CD200, EpCAM, CD133, CD166, CD206, CD44, CD49f,
Cabeza y cuello	CD44, CD271, CD166, CD133, CD24
Cérvix	ABCG2, CD133, CD49f
Esófago	CD44, CD133, CD90
Melanoma	CD20, CD271, ABCB5, CD133
Sarcomas de tejido blando	CD44, CD133, FGFR3, CXCR4, ABCG2, CD271, CD344
Sarcomas primarios de hueso	CD133, CD24, CD271, ABCG2, C-kit, CXCR4, Stro-1, SSEA-4, CD49f, CD57, Lgr5
Leucemia mieloide aguda	CD34, CD90, CD71, CD19, CD20, CD44, CD10, CD45RA, CD123
Hígado	CD44, CD90, CD133, CD13, EpCAM, CD24, CD206
Pulmón	CD44, CD133, CD166, CD133, ABCG2, CD90, CD117, CD87
Carcinoma de células renales	CD133, CXCR4, CD44, CD105
Páncreas	ABCG2, CD24, CD44, CD133, CXCR4, EpCAM
Próstata	EpCAM, CD117, $\alpha_2\beta_1$ , CD133, CD44, CXCR4

**Ensayos funcionales:** Estas técnicas se apoyan en los comportamientos característicos de las subpoblaciones CSCs para su marcaje.

Entre los métodos más extendidos, cabe destacar la medida de la actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH) mediante el ensayo Aldefluor. Estas enzimas oxidan los aldehídos tóxicos para la célula a ácidos carboxílicos, resultando esenciales para el mantenimiento de la capacidad de auto renovación en células madre y CSCs [32]. El ensayo se basa en el uso de un substrato permeable a la membrana celular que, al ser metabolizado por las ALDH,

emite fluorescencia a 488 nm, lo que hace posible su detección y aislamiento mediante citometría de flujo acoplada a un separador celular. Otro método común es el llamado “Side Population”, el cual se basa en la expulsión de compuestos fluorescentes como Hoechst 33342 o la Rodamina 123 de las subpoblaciones con alto contenido en bombas ABC [33]. Estos transportadores, altamente expresados en células madre, se encargan de expulsar una amplia gama de agentes exógenos tóxicos de la célula, por lo que están estrechamente relacionadas con la resistencia a fármacos [34]. De esta manera, el ensayo consiste en detectar y seleccionar por citometría de flujo acoplada a un separador celular, aquellas subpoblaciones que, tras ser expuestas a los compuestos fluorescentes, han logrado expulsarlos y, por lo tanto, no muestran fluorescencia. De manera similar a esta metodología, otras estrategias explotan la alta expresión de bombas ABC en subpoblaciones CSCs y, por consiguiente, la mayor resistencia a determinados agentes citotóxicos, como método de enriquecimiento en subpoblaciones CSCs en cultivos tratados con los compuestos mencionados. Considerando más ensayos usualmente empleados tanto para la cuantificación como para el aislamiento y/o enriquecimiento de cultivos en CSCs es el cultivo de tumoríferas. Esta técnica aprovecha la capacidad de crecimiento clonal en ausencia de adherencia al substrato característico de fenotipos CSCs, capacidad estrechamente relacionada con la capacidad de autorrenovación, reinicio del crecimiento neoplásico y mayor resistencia de estas subpoblaciones celulares. De esta manera, se establecen cultivos en unas condiciones que favorecerán la proliferación y supervivencia prácticamente exclusivas de CSCs, que crecerán formando esferoides celulares de origen clonal en suspensión, enriquecidos en estas células. Para ello, las células se cultivan en condiciones de baja adherencia y empleando un medio libre de suero que contiene un cocktail de factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de células madre, como EGF y bFGF entre otros.

**Capacidad tumorigénica *in vivo*:** Estas técnicas guardan una estrecha relación con la llamada “regla de oro” de las CSCs, empleada para determinar si un grupo de células puede considerarse o no como tales. Según esta regla, una población CSCs debe ser capaz de generar tumores en varias rondas de trasplantes seriados a ratones inmunodeprimidos, manteniendo en cada caso las características del tumor original y creciendo de una manera más eficiente que otra población no enriquecida en CSCs [25]. Partiendo de esta característica, algunas técnicas se basan en la realización de varias rondas de

xenotransplantes seriados en ratones inmunodeprimidos a partir de los cuales se establecen líneas celulares para inocular un nuevo ratón. Si bien mediante este método no se obtendrán CSCs completamente aisladas (debido a su capacidad de división asimétrica), si se pueden obtener cultivos celulares cada vez más enriquecidos. Además, mediante el establecimiento de xenógrafos a partir de varias diluciones celulares (ensayo de dilución limitada, LDA), es posible cuantificar e ir caracterizando el aumento en la actividad CSCs y, por consiguiente, en la capacidad de desarrollar un tumor a menores concentraciones celulares por parte de las líneas celulares establecidas [33]. Además, resulta interesante mencionar que existe la posibilidad de realizar un seguimiento *in vivo* de las subpoblaciones CSCs. Para ello, se emplean marcajes selectivos con fluorescencia, bioluminiscencia (normalmente con luciferasa), o con puntos cuánticos (quantum dots), nanocristales semiconductores fotoestables capaces de emitir luminiscencia en varias longitudes de onda) [35].

#### **1.2.2.2. Factores de transcripción asociados al fenotipo pluripotente**

La reprogramación que sufren las células somáticas para llegar a alcanzar un fenotipo tipo célula madre se induce por la sobreexpresión ectópica transitoria de determinados factores de transcripción [30]. De esta manera, resulta comprensible que algunos de estos factores aparezcan ampliamente expresados en CSCs. En este apartado se mostrarán los más relevantes.

**OCT4:** Uno de los factores de transcripción más comunmente sobreexpresado en CSCs. Tiene un papel trascendental dentro de estos fenotipos, interviniendo sobre la capacidad de autorrenovación, pluripotencia y mantenimiento de la homeostasis celular [36]. Altos niveles de OCT4 se han asociado a mayor malignidad tumoral y resistencia a fármacos en muchos tipos de tumores como gliomas [37], cáncer de mama [38] o cáncer de pulmón [39].

**SOS2:** Presenta un papel trascendental en el desarrollo temprano y mantenimiento del estado no diferenciado en células madre embrionarias, lo cual evidencia su importancia en las subpoblaciones CSCs [30]. A modo de muestra, se ha comprobado que SOX2 es la base para el mantenimiento de la capacidad de autorrenovarse y tumorigénesis en varios tipos de sarcomas como osteosarcomas, sarcoma de Ewing o rhabdomyosarcomas [40, 41]. Además, resulta trascendental para la tumorigénesis en sarcomas pleomórficos indiferenciados; en los que los altos niveles de expresión se asocian con neoplasias avanzadas y un mal

pronóstico clínico [42]. Por otro lado, se ha comprobado que es capaz de promover la metástasis en carcinomas cutáneos de células escamosas [43].

**NANOG:** Proteína codificada en un dominio “homeobox” cuya función transcripcional se asocia a la regulación de la capacidad de autorrenovación y multipotencia celular [44]. Se ha observado una expresión aberrante de este factor en múltiples tumores [30]. A modo de ejemplo, se ha correlacionado los altos niveles de expresión de esta diana a un mal pronóstico en cáncer gástrico [45], páncreas [46] y próstata, donde además se relacionó con la aparición de subpoblaciones CSCs [47, 48].

**KLF4:** Histológicamente muy extendido y con múltiples funciones. Dependiendo de distintos factores, puede tener un papel protector o inductor frente al tumor [30]. Por ejemplo, se ha sugerido que KLF4 presenta una actividad antitumoral en varios tipos de leucemia [49, 50], mientras que un nivel de expresión alto se relacionan con fenotipos agresivos en cáncer de mama [51].

**MYC:** se trata de una familia de factores compuesta por c-MYC, n-MYC y L-MYC, que regula la expresión de un amplio rango de genes con múltiples funciones entre las que se encuentra el metabolismo celular, capacidad de autorrenovación, diferenciación y crecimiento [52, 53]. Aparece activado en muchas neoplasias, sin embargo, suele requerir la acción de otros factores para el desarrollo de su potencial oncogénico [30]. Por ejemplo, la supresión de P53 puede producir una expresión aberrante de MYC mediada por RUNX3 en una gran variedad de tumores incluyendo varias leucemias o en sarcoma de Ewing [54, 55].

### **1.2.2.3. Rutas de señalización implicadas en el fenotipo CSC**

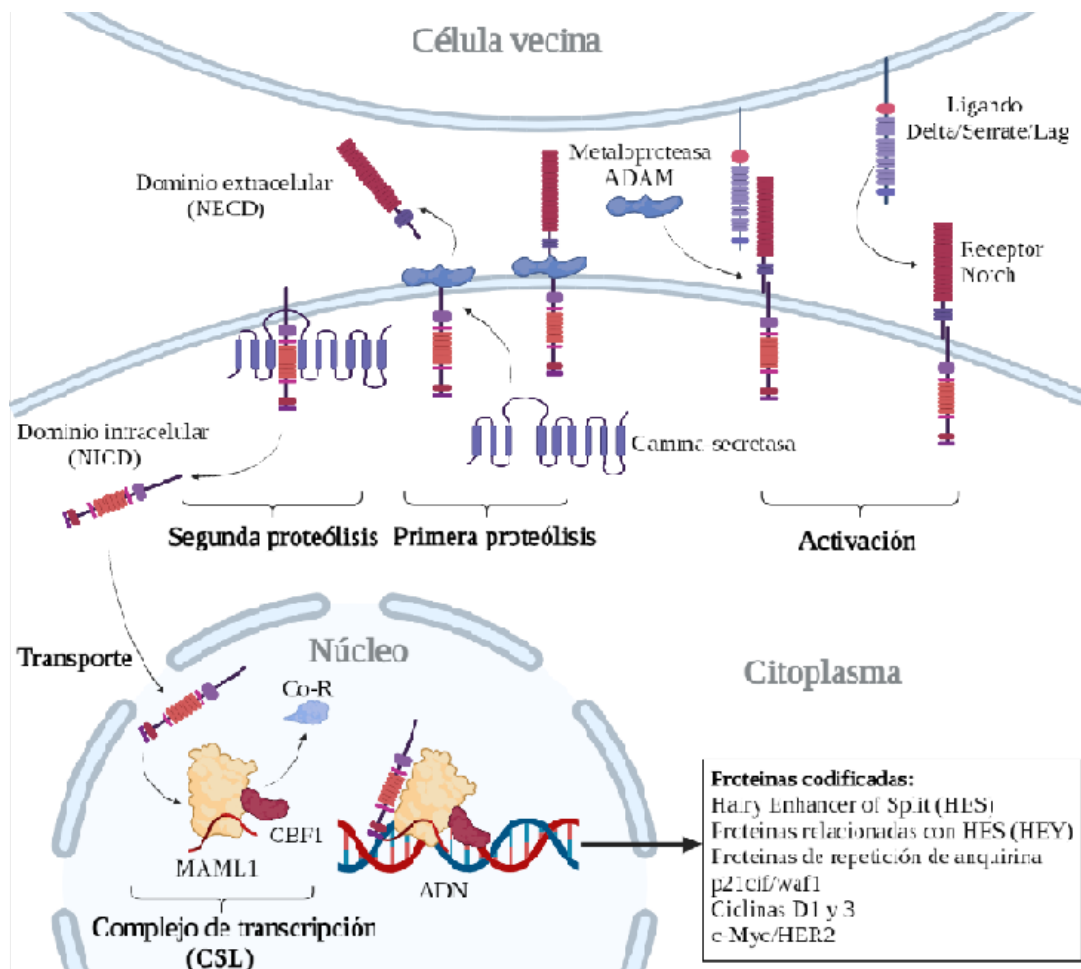
Existen determinadas rutas de señalización clave que aparecen alteradas de manera recurrente en CSCs. Suelen estar asociadas al desarrollo embrionario y al mantenimiento de la homeostasis del organismo, mostrando perfiles de regulación estrechamente interconectados entre si. Por ende, estas rutas resultan claves para el mantenimiento y el desarrollo neoplásico en el contexto oncológico.

**NOTCH:** Ruta de señalización pleiotrópica y, en términos evolutivos, altamente conservada que juega un papel clave en la comunicación entre células vecinas, resultando trascendental en el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis de organismos multicelulares [56-59]. Entre sus múltiples funciones, la señalización de NOTCH está ligada



al mantenimiento del fenotipo “célula madre” [60], así como al control de la angiogénesis, mecanismos de apoptosis, determinación del destino celular y diferenciación [56]. Algunos órganos y sistemas en los que se ha demostrado que la ruta desempeña un papel clave incluyen páncreas, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso y sistema hematopoyético [57-59, 61, 62].

Tal y como se muestra en la **Figura 3**, el primer elemento de esta cascada de señalización lo compone uno de los cuatro receptores transmembrana que toman el nombre de la ruta, NOTCH 1-4. Estos receptores pueden tener una expresión dependiente de tejido. Por ejemplo, NOTCH 1 y 2 son los receptores con mayor relevancia en tejido esquelético [63], donde actúan como antagonistas de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina, bloqueando la diferenciación osteoblástica mediante al inhibir Runx2 [63, 64].



**Figura 3:** Esquemización de la ruta de NOTCH en la que se detallan la cadena de modificaciones post-traduccionales del receptor, así como la cascada de señalización que conduce a la activación del complejo de transcripción regulado por la ruta. Fuente: Creada en Biorender.com.

La activación de la ruta se lleva a cabo mediante la interacción de uno de los receptores NOTCH con alguno de los ligandos de la familia Delta/Serrate/Lag (DSL), compuesta por jagged (JAG) 1 y 2 y delta-like (DLL) 1, 3 y 4, expresados por una célula vecina. La activación de la ruta inicia la escisión proteolítica del receptor en dos etapas. La primera está dirigida por las desintegrinas y metaloproteasas ADAM10 (también conocida por Kuz) o ADAM17 (TACE), liberando la región extracelular del receptor. La segunda la lleva a cabo el complejo  $\gamma$ -secretasa, el cual está compuesto por, al menos, cuatro proteínas individuales: presenilina 1 o 2, nicastrina, APH-1 y PEN-2. La proteólisis de NOTCH desemboca en la liberación de su dominio intracelular (NICD), considerado la forma activa del receptor, en el citoplasma. Una vez NICD alcanza el núcleo celular, formará un complejo de transcripción con el co-activador Mastermind-like1 (MAML1), el correpresor de la transcripción compuesto por CBF1/RBPjk (CSL), SKIP y p300. Dicho complejo activará la transcripción de múltiples efectores entre los que se encuentran HES 1, 5 y 7; Hey 1, 2 (también conocidos, respectivamente, como HERP 2 y 1) y L [65, 66]; mecanismos de automodulación como NRAP (inhibidor de la transcripción mediada por NICD [67], u otras dianas secundarias como las ciclinas D1 y 3, la proteína de repetición de anquirina, p21cip/waf1 o c-MYC [66, 68, 69]. Resulta importante considerar que, dada la alta complejidad de NOTCH, la expresión de los efectores finales no siempre se correlaciona directamente con la activación de la ruta. Un ejemplo de ello se encuentra en sarcoma de Ewing, donde los altos niveles de expresión de HES1 están desvinculados de la de los receptores NOTCH, apenas presentes [70]. Otra muestra de su complejidad radica en la existencia de rutas de activación no canónicas con potencial interés en cáncer y cuya importancia no está del todo definida [71-73]

Numerosos estudios han evidenciado que la ruta de NOTCH juega un papel trascendental en el desarrollo de algunos cánceres, pudiendo actuar como factor pro-oncogénico o como supresor de tumores según el tejido y el contexto celular en el que se desarrolla la neoplasia [74-76]. Resulta importante mencionar que la expresión alterada de NOTCH está estrechamente vinculada al fenotipo CSC, favoreciendo su capacidad de supervivencia, autorrenovación, metástasis y permitiéndoles esquivar los mecanismos de apoptosis en gran variedad de tumores [30, 56, 66, 68]. Para ilustrar algunos ejemplos relacionados con el papel de la ruta en diferentes neoplasias, en la **Tabla 2** se muestran algunas funciones

vinculadas al desarrollo oncológico que han sido asociadas a la expresión alterada de NOTCH en diferentes tejidos.

**Tabla 2:** Ejemplo de receptores NOTCH relacionados con el desarrollo neoplásico en diferentes cánceres

Receptor	Funciones de la ruta	Promoción tumoral	Efecto oncosupresor
<b>NOTCH 1</b>	Oncogénesis, angiogénesis, modulación inmunológica, mantenimiento del fenotipo CSCs, proliferación celular, invasión y quimio-resistencia	Cáncer de mama [68, 69, 77, 78] Leucemia [79, 80] Carcinoma quístico adenoide [68, 69] Linfoma [68] Cáncer de ovario [81] Cáncer de colon [69, 82] Sarcoma de Kaposi [83] Rabdomiosarcoma embrional [84] Sarcoma sinovial [85] Cáncer de próstata [86] Carcinoma renal [87] Osteosarcoma [88-91]	Carcinoma de células escamosas [76, 92] Cáncer de pulmón [93] Glioma de prosencéfalo [93] Tumores neuroendocrinos [76] Cáncer de hígado [94] Sarcoma de Ewing [70]
<b>NOTCH 2</b>	Regulación inmunológica neoplásica y promoción de la oncogénesis	Leucemia [79] Melanoma [95] Tumor hepático [96] Cáncer de ovario [97] Sarcoma de Kaposi [83] Cáncer de mama [78] Carcinoma renal [87]	Carcinoma de células escamosas [76] Cáncer de hígado [94] Glioma de prosencéfalo [93] Tumores neuroendocrinos [76] Sarcoma de Ewing [70]
<b>NOTCH 3</b>	Proliferación y migración celular, quimio-resistencia	Cáncer de Ovario [98] Leucemia [99] Cáncer de próstata [86]	Cáncer de hígado [94] Carcinoma de células escamosas [76] Glioma de prosencéfalo [93] Tumores neuroendocrinos [76] Sarcoma de Ewing [70]
<b>NOTCH 4</b>	Promoción de EMT, oncogénesis, proliferación celular, modulación inmunológica y mantenimiento del fenotipo CSC	Cáncer de mama [77] Melanoma [95] Sarcoma de Kaposi [83]	Glioma de prosencéfalo [93] Tumores neuroendocrinos [76] Sarcoma de Ewing [70]

Para ejemplificar el carácter pleiotrópico de NOTCH se detallarán algunos casos en los que el comportamiento alterado de la ruta se interconecta con otras cascadas de señalización frecuentemente asociadas al desarrollo neoplásico. Para comenzar, se ha reportado que los

altos niveles de expresión de los factores de transcripción HES1, así como Hey 1 y 2, descritos en subpoblaciones CSC de sarcomas pleomórficos indiferenciados, se correlacionan directamente con la expresión de varios efectores claves de la ruta Hedgehog [100]. Por otro lado, se ha asociado la sobreexpresión de los receptores NOTCH 1 y 2 con la activación de la ruta PI3K/AKT y cMyc induciendo oncogénesis en leucemias linfoblásticas agudas y leucemias linfocíticas crónicas [68, 79]. Algo similar se ha observado en osteoblastos de ratón, en los que la inactivación de p53 y la sobre-expresión de NOTCH1 mostraron una interacción sinérgica conduciendo al desarrollo de osteosarcomas [89]. Otra muestra involucra a las subpoblaciones CSC de glioblastomas, donde se demostró que la inhibición de las rutas de NOTCH y WNT/  $\beta$ -catenina favorece la diferenciación neuronal reduciendo las poblaciones CSC en el tumor [101]. Como último ejemplo, se ha reportado que la activación de la ruta NF- $\kappa$ B conduce a la activación de JAG1, clave para la oncogénesis en osteosarcomas [102].

Considerando la estrecha relación existente entre la expresión alterada de NOTCH y el desarrollo neoplásico, se han llevado a cabo múltiples investigaciones centradas en la inhibición de la ruta como base para el tratamiento oncológico. Destacan dos tipos de aproximaciones principales: el uso de inhibidores del complejo  $\gamma$ -secretasa (GSI, por sus siglas en inglés), de manera que se evite la liberación citoplasmática de NICD; y el bloqueo de la unión de los receptores NOTCH o sus ligandos mediante el uso de anticuerpos monoclonales, siendo los más empleados aquellos dirigidos contra DLL4 y NOTCH 1-3 [56]. Los GSI fueron los primeros inhibidores de NOTCH que llegaron a testarse en ensayos pre-clínicos, de manera que a día de hoy se han sintetizado más de 100 inhibidores distintos agrupados en isómeros peptídicos, azepinas y sulfonamidas [56]. Si bien, originalmente, el uso clínico de estos inhibidores se dirigía al tratamiento de pacientes de Alzheimer [103], muchos han mostrado un gran potencial antitumoral en diferentes neoplasias, logrando afectar a las subpoblaciones CSCs e inhibiendo funciones oncogénicas clave como la angiogénesis, el crecimiento celular y la quimio-resistencia [56, 104]. A modo de ejemplo, se reportó que la adquisición de capacidad metastásica y la quimio-resistencia asociada a la exposición a dosis no letales de doxorrubicina en osteosarcomas, estaba vinculada a un aumento significativo de la expresión de HES1 [88]. El mismo estudio determinó que el tratamiento con el GSI DAPT no solo era capaz de volver a sensibilizar a las células tumorales frente a la doxorrubicina, sino que mostraba un efecto antitumoral por sí mismo

[88]. La inhibición de la señalización de NOTCH mediante el uso de DAPT también logró incrementar significativamente la sensibilidad de osteosarcomas frente al cis-platino [105]. La mayor limitación del uso de los mencionados inhibidores es su alta toxicidad, la cual se asocia especialmente a daños severos en el tracto gastrointestinal del paciente, produciendo efectos secundarios tales como diarreas, náuseas, fatiga o anemia [56, 104]. Por este motivo, la ventana terapéutica de estos inhibidores suele ser muy estrecha y su utilización suele enfocarse en el uso de dosis bajas y espaciadas en el tiempo como parte de terapias combinatorias. Actualmente existen diferentes inhibidores que han culminado o forman parte de ensayos clínicos dirigidos al tratamiento de tumores sólidos avanzados. Algunos ejemplos que han mostrado resultados (normalmente modestos) a nivel clínico incluyen los inhibidores LY900008 [106], PF-03084014 [107, 108], LY-3039478 [109], R04929097 [110-113], el MK-0752 [114], o la terapia monoclonal contra DLL4 [115]. En este contexto, el uso de GSI ha mostrado un mayor éxito para el tratamiento de tumores desmoides para los que se han alcanzado las últimas etapas de los ensayos clínicos con el compuesto NCT03785964 [116].

**WNT:** Es una ruta de señalización compleja y evolutivamente muy conservada que involucra 19 ligandos y alrededor de 18 diferentes receptores y co-receptores [117, 118]. A grandes rasgos, está relacionada con la polaridad celular, así como el curso que seguirá el desarrollo celular [119]. Así, el comportamiento aberrante de esta ruta está asociado al mantenimiento de la pluripotencia en CSCs, así como en su capacidad de autorrenovación, senescencia, inhibición de la apoptosis y metástasis [30, 119]. La ruta presenta varias vías de activación, siendo la más relevante aquella que involucra el reclutamiento de la  $\beta$ -catenina como parte del complejo de transcripción [30].

Pese a que la ruta de WNT muestra una actividad alterada en múltiples tumores, existe una amplia variabilidad sobre la diana de la ruta afectada en los distintos casos [30]. Entre los efectores regulados por esta ruta es posible encontrar MYC, Oct4, EpCam, CD44, MMP7, HOXA5 TCF1, PPMP22, SMYD3 o Lgr5 [30, 33]. Considerando algunos ejemplos, la inhibición de la  $\beta$ -catenina en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, reduce los niveles de expresión de Oct4, lo que limita su crecimiento, capacidad de autorrenovación, tumorogénesis e induce mecanismos de diferenciación y quimio sensibilidad [120]; por otro lado, se ha observado que los niveles de expresión de WNT en cáncer gástrico correlacionan con los de marcadores CSCs como CD44 [121].

**HEDGEHOG:** Esta ruta de señalización se compone de una compleja red de ligandos y receptores entre los que destaca los iniciadores de la señalización SHH y IHH y los receptores PTCH y SMO, así como los factores de transcripción GLI1, 2 y 3; encargados de regular el crecimiento, proliferación y diferenciación celular [122]. En condiciones normales, la ruta está relacionada con el desarrollo embrionario y la formación del sistema nervioso, esqueleto, extremidades, pulmones, corazón e intestino [123]; sin embargo, aparece alterada en múltiples tumores y su disrupción se asocia al llamado síndrome de Gorlin, correlacionado con el desarrollo de carcinomas de células basales, rhabdomioma y meduloblastomas [124].

En neoplasias, esta ruta promueve el desarrollo y crecimiento tumoral y regula el destino de las células tumorales residuales tras un tratamiento, estando estrechamente relacionada con fenotipos CSCs [30]. De esta manera, regula positivamente algunos elementos relacionados con autorrenovación celular y metástasis como son Bmi-1, WNT2, ALDH1, CD44, CCND1, Twist1, C-MYC, Nanog, Oct4, PDGFR $\alpha$ , Snail, Jagged1 y C-MET [30]. A modo de ejemplo, se ha comprobado que la sobreexpresión de Hedgehog mediada por p63 resulta importante para el mantenimiento del fenotipo CSCs en neoplasias mamarias [125]; por otro lado, la expresión del péptido de señalización SCUBE2 inhibe la proliferación y la migración celular en subpoblaciones CSCs de gliomas mediante la disrupción de esta ruta [126].

**TGF/SMAD:** Esta ruta se relaciona con varios procesos celulares, especialmente los relacionados con el desarrollo como son la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y mantenimiento de la homeostasis [30]. Regula el complejo de transcripción compuesto por proteínas SMAD y sus principales ligandos son TGF- $\beta$ , activina, Nodal, BMP, GDF y AMH [127]. Está sobreactivado en varias neoplasias como en cáncer de pulmón, donde la señalización con TGF- $\beta$  se relaciona con el mantenimiento del fenotipo CSCs [128]; o en hígado, donde regula su capacidad de autorrenovación fomentada por ciclinas [129].

**NF- $\kappa$ B:** Se trata de una ruta de inducción rápida cuyo principal componente lo forman los complejos de transcripción NF- $\kappa$ B [130]. Esta ruta cumple un papel trascendental regulando las respuestas inmune e inflamatoria y, además, está relacionada con la supervivencia celular, proliferación y diferenciación [131]. Pese a que no suele aparecer mutada en tumores humanos [132], la activación de NF- $\kappa$ B, mediada por señalizadores asociados al contexto tumoral, resulta de gran relevancia para el desarrollo de la neoplasia [30]. En relación a las

CSCs, esta ruta interviene en la capacidad de supervivencia y proliferación de las mismas, así como en la tumorigénesis, metástasis, inducción de la angiogénesis y expresión de proteínas de adhesión [131]. Una muestra de lo expuesto es la activación de la ruta por el mediador inflamatorio PGE2 en subpoblaciones CSCs de cáncer colorrectal, lo que contribuye a la oncogénesis y al desarrollo de metástasis [133]. Otro ejemplo es la expresión de citoquinas mediada por NF- $\kappa$ B en CSCs pancreáticas; resultando en la inducción de la proliferación, supervivencia y migración de estas subpoblaciones [134].

**JACK/STAT:** Esta ruta está evolutivamente bien conservada, y sus funciones se asocian a múltiples procesos biológicos como proliferación celular, diferenciación, control de la apoptosis y regulación de la respuesta inmune [30, 135]. La ruta, comúnmente estimulada por citocinas, se compone por receptores asociados a kinasas, las tirosin kinasas JAK y la familia de factores de transcripción STAT. La sobre activación de esta ruta está asociada a malignidad en múltiples tumores [135]. La ruta de JAK/STAT resulta relevante para el fenotipo CSCs, ya que favorece mecanismos relacionados con la supervivencia celular, autorrenovación, hematopoyesis y neurogénesis embrionaria [136]. Se ha demostrado que la ruta JAK1/STAT3, activada por IL-10, favorece la autorrenovación, migración e invasión de CSCs en pulmón [137]. Además, se ha reportado que la señalización de JAK/STAT juega un clave en el mantenimiento del fenotipo CSCs en liposarcomas mixoides [138].

**PI3K/AKT/mTOR:** La ruta de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) es activada por los receptores de la tirosin quinasa (RTK) y promueve la producción de PIP3 para la activación de la familia de kinasas AKT, que participa en múltiples procesos biológicos como la supervivencia celular, proliferación, control de muerte celular asociada a no adherencia, crecimiento y metabolismo del glucógeno [139]. Entre los reguladores más importantes de la rutase encuentra la proteína PTEN, que inhibe la acción de PIP3 y, por consiguiente, la activación de AKT. Debido a su relevancia en el control de la ruta, ala pérdida de este regulador es común en múltiples tumores [139]. Por otro lado, una de las principales dianas reguladas por esta ruta es mTOR, que está asociado a varios factores de transcripción. Esta ruta interviene en el desarrollo del ciclo celular, regulando la proliferación y supervivencia celular, aunque su papel en CSCs aún está poco estudiado [30]. Se ha observado que induce proliferación celular y metástasis en cáncer de ovario [140], próstata [141] y páncreas [142], y que resulta clave en el metabolismo asociado a CSCs en pulmón [143]. Además, su expresión se asocia a marcadores de célula madre como ALDH en cáncer colorrectal o la

proteína de adhesión epitelial EpCAM en CSCs hepáticas [144]. Como dato relevante, PI3K aparece mutada en entre el 30 y el 50% de las neoplasias diagnosticadas [145]. Resulta importante mencionar la ruta Ras/Raf/Mek/Erk, que al funcionar de manera aberrante produce, en múltiples tumores, la sobreactivación de la ruta PI3K/Akt/mTOR junto con otros efectores importantes para el desarrollo y migración tumoral como es el factor de crecimiento vascular (VEGF) [146]. Como muestra de ello, la expresión aberrante de Ras aparece en más del 90% de las neoplasias pancreáticas [142, 147].

**HIPPO:** Ruta inmunosupresora estrechamente ligada al desarrollo embrionario, regulando la homeostasis tisular y el desarrollo estructural de órganos. Su activación mediada por las quinasas MST1/2 y LASTS1/2 conduce a la degradación de las proteínas YAP/TAZ, parte del complejo de transcripción que regula genes como CTGF, AXL o SURVIVIN [148]. Otros factores de transcripción regulados por estos efectores son Smad, Runx1/2 o Pax3 [149]. La disrupción de esta ruta puede inducir una proliferación celular descontrolada, además de estar relacionada con el desarrollo del fenotipo CSCs, potencial metastásico y resistencia a quimioterapia [150]. A modo de ejemplo, se ha correlacionado el mal pronóstico clínico con los altos niveles de expresión de YAP en gliomas [151] y adenocarcinomas gástricos [152].

**Epigenética:** Las modificaciones epigenéticas cumplen un papel clave en el mantenimiento del fenotipo célula madre y su alteración puede influir significativamente en la transformación a CSCs. Algunos ejemplos de reguladores importantes son las diacetilasas de histonas (HDACs) que incluyen las proteínas de respuesta a estrés SIRT y que están involucradas en múltiples procesos y rutas de señalización. Esta familia de enzimas interviene en múltiples procesos celulares, estando estrechamente ligadas al mantenimiento de la pluripotencialidad en CSCs y la supervivencia celular [153]. Otro ejemplo de modulador epigenético que regula de forma positiva el fenotipo CSC es la ADN metiltransferasa DNMT3A. Este factor promueve la metilación de novo, y su actividad está relacionada con la inactivación de genes implicados en la la diferenciación celular y la activación de otros relacionados con pluripotencia como HOXB [154]

### 1.2.3. Metástasis

La metástasis es el proceso por el cual una célula neoplásica con capacidad tumorogénica, migra desde su nódulo primario e invade un nuevo tejido donde inicia la formación de un

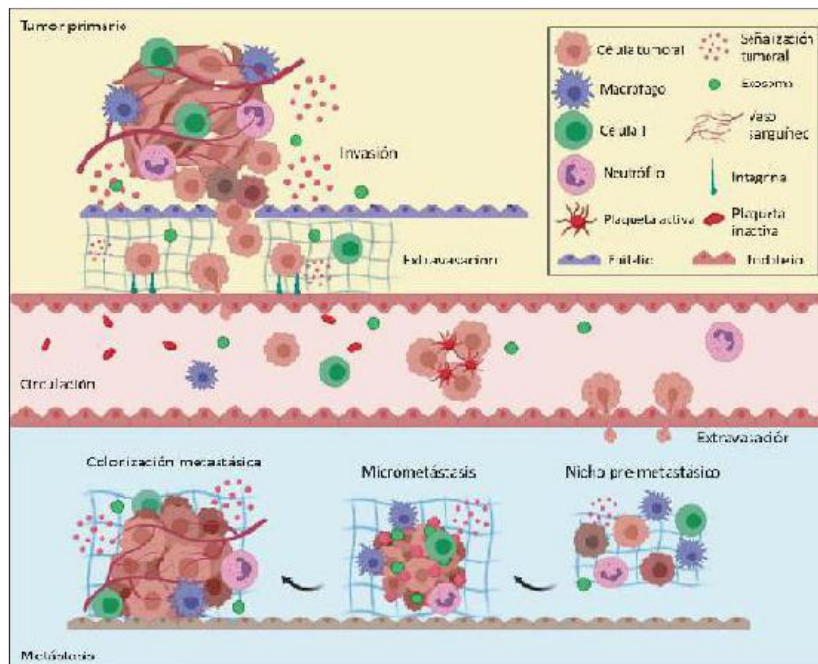


tumor. El desarrollo de metástasis se asocia con el 90% de la mortalidad vinculada a neoplasias sólidas [155]. Pese a que esta capacidad está estrechamente vinculada al fenotipo CSCs, no todas las CSCs dentro de un tumor presentan la capacidad de producir una metástasis. Por otro lado, existe la opción de que células tumorales circulantes por el organismo liberadas por el tumor, adquieran este fenotipo durante la migración [156]. El grado y los tiempos asociados a la metástasis dependen, en gran medida, de la heterogeneidad genética y epigenética dentro del tumor; así como de elementos de señalización internos y externos, como es el microambiente celular [14].

Las diferentes alteraciones que conducen al desarrollo de metástasis son producidas tanto por la inestabilidad genómica asociada al fenotipo tumoral como a la influencia del microambiente tumoral [155, 157]. A modo de ejemplo, uno de estos factores es el daño genómico asociado a la inestabilidad cromosómica produce una sobre activación de rutas proinflamatorias como NF- $\kappa$ B o sintasas de GMP/AMP cíclico estimuladoras del interferón (IFN) [158]. Otros ejemplos de factores promotores de la metástasis son la hipoxia, mediante la acción de factores inducibles por hipoxia (HIF) [159]; o la alteración metabólica relacionada con la captación del lactato por MCT1, fuente de energía principal de la célula metastásica [160]. En este contexto, es interesante mencionar que, pese a que existen cientos de genes relacionados con el potencial invasivo de la célula metastásica, se ha observado que p53, CDKN2A, PTEN, PI3K y RB1 son los más recurrentemente mutados en patologías metastásicas [161].

Resulta importante recalcar que, igual que en el desarrollo del tumor primario las alteraciones mutacionales sufridas por las células neoplásicas conducen a una selección evolutiva donde prevalecerán las mejor adaptadas al contexto oncogénico; dicha adaptación será necesaria y diferente en el entorno donde se iniciaran los nódulos secundarios [155]. Por este motivo, resulta común encontrar diferencias considerables entre el tumor primario y los crecimientos secundarios.

El desarrollo de la metástasis, desde que una célula individual (células mesenquimales) o una aglomeración de las mismas (células epiteliales) [162] adquieren el potencial invasivo en el nódulo primario hasta el establecimiento del tumor en el nuevo tejido se esquematiza dentro de la llamada cascada metastática, la cual se muestra en la **Figura 4**. Involucra 5 etapas clave:



**Figura 4:** La cascada metastásica. En el esquema se muestran de manera resumida las 5 etapas clave de la cascada: Inicio de la invasión, extravasación primaria, migración, extravasación secundaria y colonización. **Fuente:** Fares et al. 2020 [157]

**Adquisición del potencial invasivo y migración:** El inicio de la metástasis requiere la activación de una serie de factores de transcripción que son comunes tanto en fenotipos CSCs como en células mesenquimales [163]. Alguno de estos factores de transcripción son Snail, Slug, ZEB1/2, TWIST o SIP1; y están regulados por múltiples rutas de señalización como TGF/SMAD, WNT, NOTCH, Hedgehog o las rutas asociadas a receptores de las tirosin kinasas [163]. A modo de ejemplo, altos niveles de Twist se han asociado un mal pronóstico relacionada con el desarrollo de metástasis en sarcoma de Ewing [164] y osteosarcomas, donde también se ha descrito la expresión de SLUG y ZEB1/2 [165].

Si bien la expresión de estos factores ya es característica en las subpoblaciones CSCs de tumores ligados a un origen mesenquimal, como es en el caso de los sarcomas; en la mayor parte de las neoplasias malignas, de naturaleza epitelial, deben producirse una serie de transformaciones para la adquisición de un fenotipo mesenquimal que favorezca la migración y supervivencia celular [163]. Este proceso es conocido como la transformación epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés). La EMT cubre un amplio espectro de estados transitorios situados entre un fenotipo epitelial y uno mesenquimal, en las que las células metastásicas adquirirán capacidad migratoria, perderán las conexiones intercelulares

y generarán un nicho favorable para la invasión [157]. Algunos marcadores característicos de esta transición son la pérdida de las E-cadherinas a cambio de la expresión de marcadores mesenquimales como la vimentina o la N-cadherina [166]. Pese a que son múltiples los factores de crecimiento, las rutas de señalización e interacciones extracelulares que regulan esta transición, se considera que TGF- $\beta$  es el principal inductor de este proceso [166]. Resulta importante mencionar que la EMT también se ha relacionado con la desdiferenciación a fenotipos CSCs desde células somáticas [167].

En términos estructurales, resulta necesario generar un nicho metastásico en el cual la célula pueda migrar hacia la membrana basal del tejido de cara a iniciar el transvase a la vía migratoria [155]. Para ello, diferentes efectores actúan con el fin de remodelar la matriz extracelular, compuesta mayormente por proteoglicanos, colágeno, lamininas, fibronectina, elastina así como varias glicoproteínas y proteasas [157]. Cabe destacar el importante papel desempeñado por las metaloproteasas (MPPs), claves para la remodelación de la matriz durante el desarrollo tumoral y cuya sobreexpresión está asociada un mal pronóstico clínica en varios tumores [168]. Asimismo, la remodelación del hueso por parte de los osteoclastos esta mediada por RANKL, por ende, su expresión resulta clave en procesos metastásicos asociados a hueso [169]. El control de la adhesión de la célula con la matriz también requiere varias modificaciones. En este contexto debe resaltarse el papel de las integrinas. La interacción de estos receptores con la matriz provoca la activación de múltiples rutas de señalización cuya disrupción está altamente asociado a invasión y metástasis. Entre ellas cabe destacar la interacción con las quinasas de adhesión focal (FAK), que inducen la activación de SRC [155, 170]. Otras proteínas importantes son las isoformas de CD44, que actúan como receptores de varios factores de crecimiento y de hialuronano extracelular; así como molécula de adhesión [171, 172]. Adicionalmente, resulta necesaria la pérdida de las conexiones intercelulares, especialmente relevantes en tumores derivados del epitelio. Los componentes más relevantes de estas conexiones son las E-cadherinas y las claudinas [155]; reguladas por factores de transcripción como Snail o Slug; citocinas inflamatorias; metaloproteasas; rutas de señalización oncogénicas como NOTCH o WNT; y factores de crecimiento como EGF, HGF o IGF [155].

Durante esta etapa se desarrollan otros procesos también relevantes, como la emisión de exosomas, citocinas y factores de crecimiento que prepararán un nicho pre-metastásico en la región donde se iniciará el tumor secundario [157]. En este contexto, la adquisición del

fenotipo CSCs/mesenquimal, así como las reestructuraciones estructurales necesarias para la metástasis no están únicamente reguladas por las células neoplásicas. Así, la reprogramación de células no malignas juega un papel esencial en el proceso, destacando entre ellas los fibroblastos asociados a tumores (CAFs). De esta manera, se refuerza la señalización pro-oncogénica y se favorece el crecimiento del tumor, inmunosupresión, reprogramación de células del estroma y desarrollo de metástasis [155, 157].

**Invasión de la membrana basal:** En esta etapa se produce la extravasación desde el lumen hacia las vías de migración y está mediada por la comunicación con la matriz extracelular, con células vasculares o células del mesotelio en caso de metástasis transcoelómica. El mecanismo por el cual la célula se sitúa en los límites de la vía a través de la que realizará la migración y realiza el transvase, presenta múltiples similitudes con la división mitótica [173]. Además, durante el proceso el núcleo celular debe disgregarse y reconstruirse, lo que provoca una reorganización genómica clave para el potencial metastásico de la célula [174]

**Migración a través del organismo:** La célula es transportada a través de las rutas de migración, normalmente, vasos sanguíneos preexistentes o formados por la inducción de la angiogénesis en torno al tumor [175]. Otras vías incluyen la migración a través de los vasos linfáticos, donde la adaptación metabólica regulada por el factor de transcripción YAP resulta clave [176]; o la migración a cavidades del organismo (metástasis transcoelómica) como son la cavidad peritoneal o pleural [155, 177].

**Extravasación al nuevo tejido:** En esta etapa se produce una interacción con las células del endotelio donde se producirá la extravasación previa al inicio de la invasión hacia el tejido. El mecanismo de extravasación es complejo y necesita de la interacción de múltiples efectores como las integrinas, que vuelven a jugar un papel trascendental determinando el lugar de extravasación y colonización y manteniendo la supervivencia celular independiente de su estructura [178]. Se ha reportado que las células tumorales inducen necrosis programada en las células endoteliales para facilitar el transvase e inician una migración a través del endotelio similar a la que realizan los leucocitos [157]. Dependiendo del origen del tumor primario, puede existir una predisposición a iniciar nódulos secundarios en regiones concretas, aunque la mayor incidencia de metástasis suele darse en regiones muy vascularizadas como el hígado o el hueso [157].

**Invasión del tejido secundario y formación de la micro/macro metástasis:** Se culmina el proceso migratorio hacia el tejido donde comenzará la adaptación al nuevo contexto microambiental. Durante esta etapa, muchos tumores de naturaleza epitelial revierten la TEM hacia un fenotipo epitelial [179]. También existe la posibilidad de que las células metastásicas entren en senescencia, provocando la aparición tardía de nódulos secundarios.

### **1.3. Tratamiento del Cáncer**

A la hora de plantear el tratamiento a un paciente con una patología neoplásica, deben tenerse en cuenta las múltiples aproximaciones disponibles; siendo necesario considerar las particularidades de cada procedimiento, las características específicas del tumor y el estado fisiológico del paciente. La búsqueda de marcadores identificativos de un tumor, así como de su estadio de malignidad, es una de las bases de la terapia personalizada.

#### **1.3.1. Terapias empleadas en clínica**

El objetivo del tratamiento del cáncer debe ser la completa eliminación del tejido neoplásico causando el menor daño posible a tejidos sanos. Si la eliminación total del cáncer no es posible, el tratamiento debe centrarse en suprimirlo hasta un estadio subclínico que permita al paciente mantener una calidad de vida normal durante el mayor periodo de tiempo posible [180]. A continuación, se detallarán los tratamientos contra el cáncer más estandarizados en la clínica:

**Cirugía:** Se realiza en neoplasias sólidas, mediante la eliminación quirúrgica, parcial o completa, del tejido neoplásico. Dependiendo de la expansión del tumor, puede requerirse la eliminación completa de un órgano. En casos de metástasis, no suele ser posible la completa eliminación de los tumores por vía quirúrgica [180]. Si la eliminación total de la masa tumoral mediante la cirugía no puede llevarse a cabo, la enfermedad residual puede dar lugar a recidivas. Por tanto, el estudio patológico del tejido extraído resulta esencial para guiar el tratamiento adyuvante más indicado para prevenir recaídas. En términos generales, suelen aplicarse tratamientos adyuvantes como la radioterapia o la quimioterapia para la eliminación completa de poblaciones malignas.

**Quimioterapia:** La quimioterapia se basa en el uso de uno o más agentes químicos dirigidos contra poblaciones celulares con altos niveles de proliferación, como son la mayoría de subpoblaciones tumorales. Sin embargo, estos tratamientos tienen importantes efectos

secundarios dañando células sanas, especialmente aquellas con una alta tasa de recambio. Además, no serían eficientes para eliminar subpoblaciones tumorales quiescentes, un estado frecuentemente adoptado por las CSCs como mecanismo de supervivencia a estos tratamientos.

**Radioterapia:** Durante la radioterapia se emplean altas dosis de radiación, normalmente ionizante, de manera externa o interna, con el fin de destruir el tejido tumoral. La radiación producirá grandes daños en el ADN de las células, especialmente aquellas con alta actividad proliferativa. Suelen usarse en combinación con la cirugía permitiendo disminuir el tamaño del tumor. Entre los efectos adversos de la radioterapia, además del daño producido a tejidos sanos, se encuentra la activación de la TEM y el favorecimiento de la metástasis mediante la alteración de TGF- $\beta$ , SNAIL y TWIST, y la inhibición de p53 [22]. Por este motivo, se evita aplicar radioterapia en regiones vulnerables o en tumores de alto grado [180].

**Inmunoterapia:** Muchos investigadores plantean un cambio de perspectiva en lo concerniente a considerar el cáncer como una enfermedad del sistema inmune, estando muy ligado, por ejemplo, al control de eventos metastásicos [181]. La inmunoterapia se basa en la eliminación del tumor a través de la promoción de la respuesta inmune del propio paciente contra el tumor.

Se han logrado grandes resultados mediante el empleo de vacunas dirigidas a crear una memoria inmunológica contra dianas tumorales específicas o mediante el tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunológicos y/o agonistas para la activación de rutas estimuladoras [182]. Otras aproximaciones incluyen el uso de anticuerpos monoclonales para el bloqueo de dianas oncogénicas específicas o el marcaje inmunológico de células tumorales favoreciendo el reconocimiento por parte del sistema inmune [180]. Pese a estos avances, la acción inmunosupresora de las CSCs provoca que una porción importante de los pacientes no responda o generen resistencia contra las terapias actuales [183]

**Terapia hormonal:** Se emplea en casos en los que el cáncer es altamente dependiente de la señalización hormonal para crecer y propagarse. En estos casos los efectos secundarios dependen mucho de la edad y el sexo del paciente [180].

**Terapias dirigidas:** El uso de drogas que afecten rutas metabólicas específicas que puedan ser relevantes en el desarrollo de una neoplasia es una de las estrategias de tratamiento más

estudiadas en los últimos años. La detección rápida de rutas alteradas en los tumores de pacientes es una de las bases para el desarrollo de terapias personalizadas. Se discutirán algunas de estas aproximaciones en apartados posteriores.

**Microambiente tumoral:** El microambiente tumoral juega un papel trascendental en el desarrollo y supervivencia del tumor. Por este motivo, se han planteado múltiples terapias dirigidas a células no malignas, dianas de señalización, o promotores de la angiogénesis que puedan favorecer la evolución neoplásica [184], en combinación con otras terapias ya establecidas dirigidas al tumor [180].

### 1.3.2. Mecanismos de resistencia a los tratamientos antitumorales

Desde que Bonnet y Dick identificaron la primera CSC aislada de una leucemia mieloide aguda en 1997 [185], la visión del cáncer como una enfermedad únicamente definida por una proliferación y supervivencia celular aberrantes ha sufrido un cambio de paradigma con importantes implicaciones respecto a su tratamiento [14]. De esta manera, el estudio y comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta neoplásica a la terapia no debe centrarse únicamente en la consideración del tumor como una masa homogénea; sino más bien como un conjunto heterogéneo de subpoblaciones neoplásicas que influyen y son influenciadas por el entorno extra e intracelular.

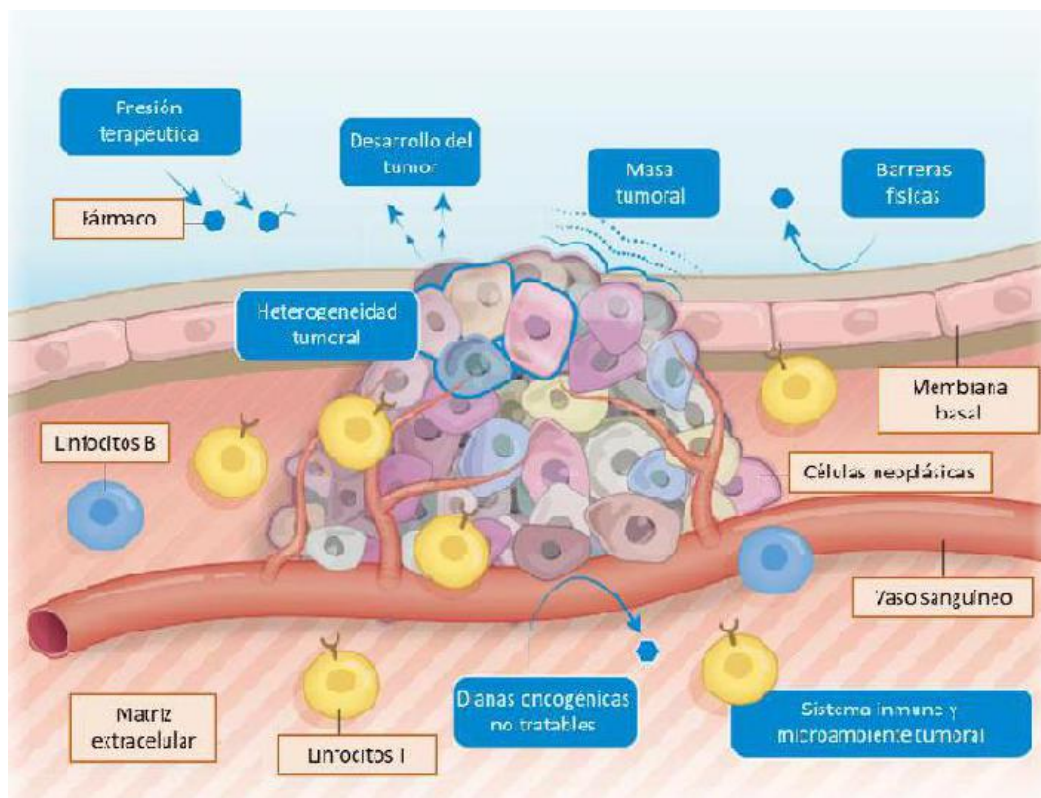
#### 1.3.2.1. Mecanismos de resistencia globales

Las células tumorales cuentan con una serie de mecanismos de resistencia que les permiten defenderse y adaptarse ante los mecanismos de autorregulación del propio organismo, así como a condiciones de estrés celular como los que pueden provocar las terapias anti-tumorales. En la **Figura 5** se esquematizan los mecanismos más relevantes.

**Inestabilidad transcripcional:** La alta tasa replicativa y el comportamiento aberrante de los mecanismos de reparación genómica y apoptosis, dotan a las células tumorales de una amplia inestabilidad genómica y cromosómica [186]. Partiendo de esta afirmación, existe la posibilidad de que determinadas subpoblaciones que hayan generado de manera intrínseca resistencia o mayor capacidad adaptativa a determinadas condiciones de estrés, sean seleccionadas tras un determinado tratamiento. Otra posibilidad radica en la presión adaptativa que la exposición al tratamiento provoca en el tumor, de manera que por mediación epigenética o genómica ciertas subpoblaciones acaben adquiriendo la resistencia

[187]. En ambos casos, los tratamientos empleados pueden afectar a las células neoplásicas o a las células no malignas asociadas al tumor, causando modificaciones en la tasa replicativa, rutas de señalización o incluso cambios a nivel histológico [188].

**Masa tumoral:** La resistencia neoplásica al tratamiento puede estar ligada a su propia estructura, de hecho, se ha observado una correlación directa entre el tamaño/cantidad de células de un cáncer con su mal pronóstico clínico [188]. A lo largo del tumor, existen gradientes espaciales en los que el acceso al flujo sanguíneo es variable; por consiguiente, resulta posible que determinadas regiones de la masa tumoral se encuentren en ambientes hipóxicos (pro-oncogénicos) y estén menos expuestos a fármacos o al control inmunológico.



**Figura 5:** Principales factores asociados a la resistencia del tumor al tratamiento. **Fuente:** Modificación de Vasan et al, 2019 [188]

**Células asociadas:** La acción protectora de células del estroma que han sido reclutadas o las células tumorales puede resultar clave, sea favoreciendo una respuesta inmune que pueda atenuar los efectores antitumorales [189], o limitando el acceso a dichos agentes [188]. Entre estas células se incluyen CAFs, células madre mesenquimes sanas, adipocitos asociados al



cáncer, células relacionadas con el sistema inmune como macrófagos, linfocitos T o células supresoras derivadas del mieloide [190].

### 1.3.2.2. Resistencia asociada a CSCs

Tal y como se ha mencionado en apartados anteriores, las CSCs presentan mecanismos de resistencia específicos que les permiten sobrevivir aun cuando la mayoría de la masa tumoral se ha eliminado. En este apartado se detallarán estos mecanismos.

**Dormancia:** Tradicionalmente, los tratamientos de quimioterapia emplean agentes cuya acción se dirige a poblaciones con alta tasa replicativa. Sin embargo, las CSCs pueden entrar en un estado de quiescencia como respuesta a determinados estímulos. Este estado está caracterizado por la detención transitoria del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>, siendo la célula capaz de reanudar el ciclo en respuesta a una nueva estimulación mitótica [191]. La dormancia resulta clave para el mantenimiento de la homeostasis tisular tanto en células madre sanas como en CSCs, suponiendo un mecanismo esencial durante el desarrollo temprano del tumor, EMT, metástasis y resistencia a condiciones de estrés [192]. Las células senescentes son clínicamente indetectables y, dependiendo del tumor, pueden mantenerse en este estado largos periodos de tiempo o iniciar la recidiva a corto plazo [191].

En la inducción de la dormancia pueden intervenir múltiples factores, desde la regulación epigenética [191], la mediada por factores de crecimiento [193], o la llevada a cabo por elementos del nicho neoplásico como los CAFs [194]. El papel en la dormancia de estos últimos aún está por esclarecer, pudiendo mostrar influencias contradictorias en una misma histología [195]. En lo que concierne a las rutas de señalización, algunos estudios mostraron que la inhibición de la ruta PI3K resulta clave para la inducción de quiescencia y la activación de la autofagia en condiciones de estrés nutricional [196]. Otra ruta estrechamente involucrada es TGF/SMAD, que es capaz de inducir dormancia mediante la promoción de EMT en cáncer de pulmón [197] y leucemia mieloide crónica [198]. Considerando algunos ejemplos de regulación asociada al nicho oncológico, se ha evidenciado la importancia de la regulación mediada por varios miRNAs en tumores de mama, glioblastomas y osteosarcomas [199]. Por otro lado, se ha demostrado que las células T son capaces de parar el ciclo celular de las CSCs mediante la señalización con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [183] y revertirlo en ausencia de ambos [200].

**Inmunosupresión:** La acción del sistema inmune contra las células tumorales, reconocidas a través de antígenos oncogénicos específicos, resulta clave para el control de su propagación por el organismo. Sin embargo, se ha demostrado que las CSCs son capaces, en muchas ocasiones, de esquivar la acción del sistema inmune mediante la liberación de moléculas inmunosupresoras; el reclutamiento y reprogramación de células del sistema inmune; y la disminución en la expresión de marcadores tumorales antigénicos [191]. De esta manera, se ha demostrado que estas subpoblaciones son capaces de inhibir el MHC-1, así como el estimulador MHC-2 en células presentadores de antígeno [201].

**Transportadores:** Uno de los rasgos protectores más característicos de las células madre y las CSCs es la sobreexpresión de transportadores de membrana capaces de expulsar de manera activa un amplio rango de compuestos exógenos de diferentes naturalezas fuera de la célula, además de estar relacionados con la liberación de otras moléculas reguladoras asociadas a la regulación mediada por células madre [191]. En condiciones normales, la expresión de estas bombas se relaciona con el transporte de sustancias a través de la placenta, intestino y barrera hematoencefálica; sin embargo, en un contexto neoplásico, estas resultan clave para expulsar agentes citotóxicos fuera de la célula. Los niveles de expresión de estos transportadores aumentan conforme la célula madre esté menos diferenciada [202]. En subpoblaciones CSCs, los principales transportadores asociados a la resistencia de tratamientos son ABCB1 y ABCG2 [202]. Otros mecanismos de expulsión de elementos potencialmente citotóxicos involucran el aumento de la actividad lisosomal mediada por la sobreexpresión de ATPasas vacuolares [203].

**Protección y reparación del ADN:** Se ha demostrado que las células madre y las CSCs son capaces de proteger y reparar el ADN de manera más eficiente que otras células [191]. Uno de los principales focos de daño a nivel genómico y, por consiguiente, activación de la apoptosis; es la acción de elementos con alto potencial RedOx, como pueden ser aldehídos o las múltiples especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las células madre y las CSCs, son capaces de disminuir de manera significativa los niveles de este tipo de compuestos mediante la sobreexpresión de elementos oxidantes como la aldehído deshidrogenasas [32], mencionada en apartados anteriores; o enzimas relacionadas con la oxidación de ROS como la superóxido dismutasa, superóxido reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa o Apel/Ref-1 [204]. Los bajos niveles de ROS actúan como mensajeros intracelulares relacionados con la homeostasis y control del ciclo celular;

regulando la expresión de efectores como HIFs, p38 o p53 [191]. Por otro lado, se observado que las células madre y las CSCs sobreexpresan enzimas relacionadas con la reparación del ADN como las N-metiltransferasas (NMT) [205], y controladores del ciclo celular como ATM, Rad17 o Chk1/2 [206].

**Alteración de la señalización apoptótica:** Más allá de la alteración de rutas asociadas a la señalización de rutas asociadas con la muerte celular [191], la sobreexpresión de proteínas con actividad anti-apoptóticas resulta clave para la supervivencia de las subpoblaciones CSCs. Algunas de proteínas anti-apoptóticas más relevantes son BCL-2 o la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis [207, 208].

## **2. Sarcomas**

Los sarcomas comprenden un complejo grupo de patologías neoplásicas derivadas de células madre mesenquimales originarias del mesodermo o del ectodermo. Son considerados tumores raros, representando menos de un 1% de los diagnósticos de cáncer a nivel global [209]. Sin embargo, ocupan el tercer lugar entre las neoplasias con mayor incidencia pediátrica, comprendiendo un 12-15% de las mismas [210]. En términos generales, se les considera tumores agresivos dado su alta capacidad metastásica. Con respecto a esto, mientras que en tumores localizados la tasa de supervivencia a 5 años es aproximadamente, del 70%, esta disminuye a menos de un 20% a 3 años en pacientes con patologías avanzadas y metástasis [211, 212].

### **2.1. Origen y desarrollo del sarcoma**

En términos generales, se ha aceptado que la sarcomagénesis se origina, muy probablemente, a partir de la transformación neoplásica de células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) o de células progenitoras derivadas de ellas [172, 213, 214]. Esto resulta congruente con la cantidad de mecanismos asociados al fenotipo CSCs que tienen una importancia clave en las MSCs [172]. La generación de modelos celulares de diferentes sarcomas mediante la modificación secuencial de MSCs refuerza esta afirmación; de esta manera, es posible encontrar modelos de sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma alveolar, liposarcomas mixoides, osteosarcomas, sarcoma de Kaposi y otros tipos de sarcomas generados a mediante la transformación tumoral de MSCs [20, 213-217]. Apoyando estos datos, se ha evidenciado que las MSCs de ratón tienden, a largo plazo, a acumular mutaciones que favorecen la transformación oncogénica en cultivos *in vitro* en los que se favorece la selección clonal de células transformadas. Tras su inoculación en ratones inmunodeprimidos, estas líneas fueron capaces de generar tumores con propiedades histopatológicas similares a fibrosarcomas y osteosarcomas [20, 218]. En otros estudios, se han conseguido revertir células neoplásicas de sarcomas derivadas de translocaciones cromosómicas a un fenotipo MSC sano mediante la represión de oncogenes de fusión claves a través del uso de shRNAs [172].

Resulta importante mencionar que, además de una mayor inestabilidad cromosómica, las mutaciones más recurrentes los modelos murinos de sarcomagénesis descritos fueron p53 y

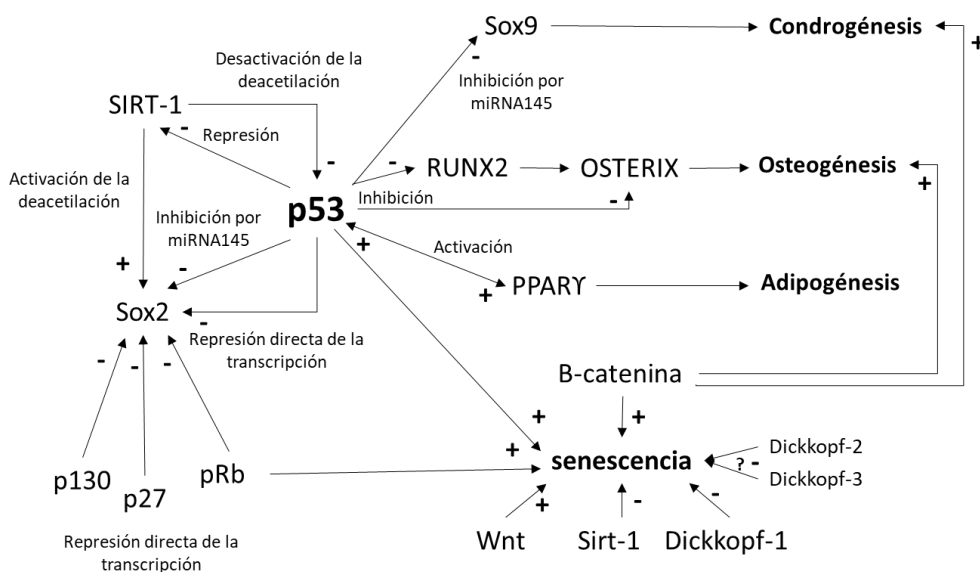
la proteína del retinoblastoma (Rb), así como la pérdida de CDKM2A/p16 [20, 218]. Estos resultados subrallan el papel clave de la alteración de la actividad de proteínas oncosupresoras en el proceso de transformación neoplásica. De hecho, la disrupción congénita de p53 está asociada al llamado síndrome de Li-Fraumeni, relacionado a su vez con el desarrollo de múltiples neoplasias [219, 220]. Considerando algunos ejemplos, se ha demostrado que la alteración de p53 es recurrente en múltiples sarcomas, destacando osteosarcoma; sarcoma de Ewing; condrosarcoma; rabdomyosarcoma; leiomyosarcoma; liposarcoma; sarcoma sinovial; angiosarcoma; y sarcoma pleomórfico no diferenciado (UPS, por sus siglas en inglés) [221]. Por otro lado, la disrupción congénita de Rb está ligada al llamado síndrome del retinoblastoma hereditario, también asociada a múltiples procesos neoplásicos [220, 222].

En este apartado, se detallarán las características de MSCs, así como los mecanismos reguladores que permiten el mantenimiento del fenotipo “célula madre” o que guían su diferenciación. Por otro lado, se relacionarán estos mecanismos con la transformación que pueden conducir al desarrollo del tumor.

### **2.1.1. Células madre mesenquimales**

Las MSCs son las células encargadas del mantenimiento de la homeostasis, renovación y remodelación en tejidos mesenquimales. En términos de pluripotencialidad, se encuentran en lo más alto de la jerarquía celular, pudiendo seguir tres grandes vías de diferenciación determinadas por diferentes estímulos: la osteogénica, la adipogénica y la condrogénica [223]. Otros posibles destinos de diferenciación alternativos a las tres principales vías son células del estroma como pueden ser fibroblastos, células endoteliales o, incluso, células asociadas al sistema inmune [172].

El potencial y regulación de la diferenciación en MSCs puede variar según su posicionamiento dentro del organismo [24], siendo sus localizaciones más estudiadas la médula ósea y el tejido adiposo, aunque podrían aparecer en cualquier tejido de origen mesoérmico [224]. En la **Figura 6** se muestran los principales mecanismos de señalización involucrados en el mantenimiento del estado indiferenciado y en la diferenciación de las MSCs a sus tres principales linajes.



**Figura 6:** Rutas reguladoras involucradas en las tres principales vías de diferenciación de MSC.

**Fuente:** Hatina et al, 2018 [172].+

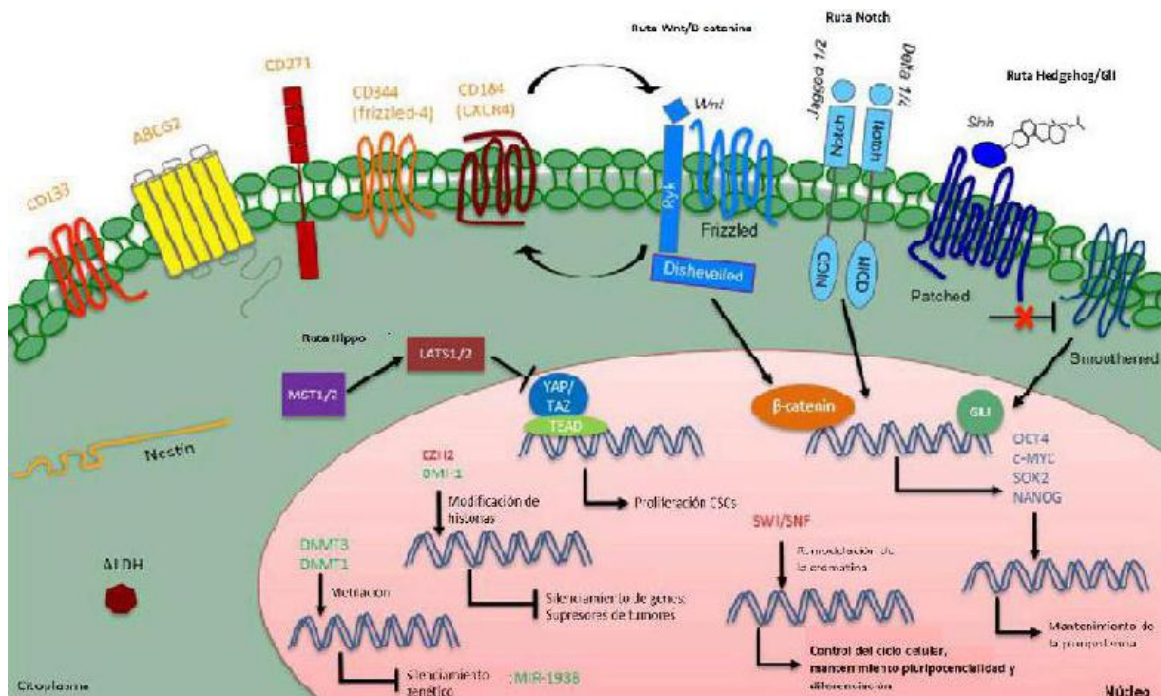
Como se puede observar en la **Figura 6**, el factor de transcripción Runx2 resulta clave en la diferenciación osteogénica mediante la modulación del factor Osterix [172]. Las interacciones entre las proteínas de membrana de la MSC y las de la matriz extracelular en el hueso también influirán en gran medida el curso de diferenciación mediante la regulación de Runx2 mediada por Smad [172]. Por otro lado, la diferenciación adipogénica está principalmente regulada por PPAR $\gamma$ , activado por los factores C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ . Con respecto a la diferenciación condrogénica, es el factor de transcripción Sox9 el que juega un papel clave [172, 225]. Otros efectores de suma importancia en el control de la diferenciación de las MSC son SIRT-1 y Sox2, factores que favorecen el mantenimiento de un estado multipotente y que son reprimidos por la acción de p53 de forma directa o indirecta (mediante la sobreexpresión miRNAs y factores de crecimiento como HIC-1)[172, 226, 227]. Además, Sox2 también puede estar reprimido por la acción conjunta de p130, p27 y Rb [228]. Resulta importante recalcar el papel de p53 en la modulación de la capacidad de diferenciación MSCs. Por una parte, este supresor de tumores puede favorecer la diferenciación adipogénica mediante el control de los niveles de ROS y la activación de PPAR $\gamma$  [172]. Por otro lado, p53 inhibe la diferenciación osteogénica mediante la represión de Runx2 y Osterix [229], y la condrogénica mediante la señalización de distintos miRNAs [172, 230].

### 2.1.2. CSCs en sarcomas

Las subpoblaciones CSCs en los sarcomas mantendrán una jerarquía similar a las MSCs en tejidos sanos. Si bien en algunos tumores la vía de diferenciación a la que tenderá la CSCs está bien discernida, por ejemplo la osteogénica en osteosarcomas; en otros casos el patrón de diferenciación no está tan definido, como es el caso de los sarcomas pleomórficos no diferenciados [172]. En casos de tumores muy avanzados es común encontrar un menor grado de diferenciación, de manera que las características asociadas a fenotipos CSCs se remarcan [172].

#### 2.1.2.1. Señalización CSCs

La disrupción o el comportamiento aberrante de rutas asociadas con la diferenciación celular en MSCs resulta clave para el desarrollo del sarcoma. Sin embargo, es importante considerar que la regulación de estos mecanismos puede variar en función del origen de la MSCs. En la **Figura 7**, se muestra un esquema con los efectores más comunes asociados a estos fenotipos.



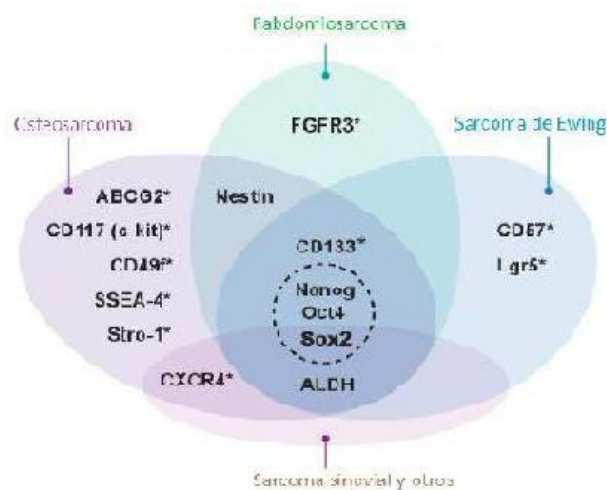
**Figura 7:** Principales efectores y rutas de señalización asociados a fenotipos CSCs en sarcomas **Fuente:** Modificación Genadry et al, 2018 [29]

Considerando los principales factores transcripción embrionarios asociados a pluripotencia, Sox-2 resulta el principal efector en subpoblaciones CSCs de sarcomas [41, 42, 231]. A modo de ejemplo, se ha observado que el desarrollo y supervivencia de muchos sarcomas, incluyendo sus poblaciones CSCs, es dependiente de la expresión de Sox-2 y/o SIRT-1 [172]; cuyos altos niveles de expresión son indicativos, en muchos casos, de un pronóstico desfavorable [40, 232] [42]. Otros factores clave son Oct3/4, Nanog o KLF4 [24]. Por otro lado, la acción de los supresores de tumores p53 y pRb juegan un papel clave en el control del desarrollo tumoral promoviendo la senescencia. Si bien durante las neoplasias este es un mecanismo clave para la supervivencia de las CSCs, en las primeras etapas del sarcoma la activación de la senescencia puede actuar como una barrera a la proliferación tumoral [172]. Un dato interesante es que más de un 70% de los osteosarcomas presentan variaciones estructurales o mutaciones en el gen de p53, al contrario de lo que ocurre en sarcoma de Ewing, donde el efecto inhibitorio de la proteína de fusión característica de estos tumores, EWS-FLI1, deja en un segundo plano las alteraciones que puedan acontecer en este gen [221]. La ratio de mutaciones en p53 también es alto, cercano a un 50%, en leiomiomas y liposarcomas no diferenciados [221] Otra ruta importante involucrada en la adquisición del fenotipo CSCs en varios sarcomas es WNT/ $\beta$ -catenina, cuya actividad se relaciona con la inducción de senescencia y diferenciación osteogénica o condrogénica en las MSCs [172]. Se ha observado que la disrupción de la ruta mediante el uso de inhibidores como Dickkopf es capaz de inmortalizar MSCs, además de incrementar la actividad ALDH1 [172, 233, 234]. En esto contexto también cabe mencionarse la ruta de NOTCH, que juega un papel trascendental en el desarrollo tumoral en sarcomas de Kaposi [66], osteosarcomas [213], sarcoma de Ewing, sarcomas sinoviales y rhabdomiomas [235], tal y como se detalló en apartados anteriores. Otras rutas relevantes asociadas a fenotipos CSCs en sarcomas son Hedgehog, Hippo o ALK [172, 213, 236-239].

#### **2.1.2.2. Marcadores CSCs en sarcomas**

Como se ha revisado en capítulos anteriores, la detección y caracterización de subpoblaciones CSCs se lleva a cabo mediante ensayos funcionales en los que se estudian características biológicas asociadas a estos fenotipos, y/o a través de la separación mediante citometría de flujo de aquellas células que expresan marcadores de membrana o factores de transcripción relacionados con pluripotencia previamente marcados. En la **Figura 8** se listan algunos de los principales marcadores empleados para el aislamiento de CSCs en diferentes sarcomas.





**Figura 8:** Recopilación de los principales marcadores CSCs identificados en sarcomas. En la parte central del diagrama se localizan los factores de pluripotencia embrionarios más importantes. Las dianas marcadas con un asterisco se localizan en la membrana. **Fuente:** Modificación Skoda et al, 2018 [24]

**Ensayos funcionales:** Considerando algunos ejemplos, se pueden destacar varios estudios en los que se han logrado aislar subpoblaciones celulares con características atribuibles a las CSCs en diferentes histologías de sarcomas [24, 31]. Por un lado, se han aislado células de osteosarcoma y condrosarcoma a partir de su capacidad para formar tumorosferas, con una capacidad tumorigénica incrementada al ser inoculadas en modelos animales. Estas células sobreexpresaban factores de pluripotencia embrionales como OCT4 o NANOG y mesenquimales como STRO1, CD44 o CD105, además de mostrar una expresión incrementada de transportadores ABC así como una mayor quimio y radioresistencia [240-242]. También son múltiples los estudios en los que han aislado CSCs mediante el método SP. En este contexto, se ha logrado probar la mayor capacidad tumorigénica y de autorenovación de estas células tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* [243, 244]. Por otro lado, la selección de subpoblaciones celulares resistentes mediante la exposición a agentes antitumorales como la doxorubicina, el metotrexato o el cisplatino han permitido la obtención de cultivos con una mayor proporción de células positivas en ensayos SP y una mayor capacidad tumorigénica [245-247]. En relación a lo mencionado, se ha comprobado que las células expuestas a agentes citotóxicos presentaban alteraciones en varias rutas de señalización asociadas a pluripotencia como VEGF, NOTCH o WNT [248-250]. En otros estudios, ha reportado que células de osteosarcoma tratadas con doxorubicina mostraron patrones de metilación alterados así como sobreexpresión de bombas ABC y del factor de

transcripción KLF4 [251-253]. Es importante no dejar de mencionar la selección de CSCs a partir de su actividad ALDH, la cual ha sido empleada para seleccionar o monitorizar la evolución de las subpoblaciones CSCs en diferentes sarcomas [240, 254-257]. Resulta interesante mencionar que la actividad ALDH se ha correlacionado con la expresión de Sox2 en múltiples sarcomas [24, 258, 259]. Considerando un último ejemplo de ensayo funcional empleado para el aislamiento de CSCs, se han separado subpoblaciones celulares en estado de dormancia en osteosarcomas mediante el uso del tinte de retención a largo plazo PKH26, marcando con mayor intensidad aquellas células con una tasa replicativa nula o muy baja [260]

**Biomarcadores:** Poniendo en foco en la selección de CSCs mediante citometría de flujo a partir de la expresión de biomarcadores, se han logrado aislar subpoblaciones celulares con características similares a las descritas en el párrafo anterior según la expresión del marcador de membrana CD133 de manera individual o en combinación con otros marcadores como CD44 en osteosarcomas, condrosarcomas y rhabdomyosarcomas [261-268]. Otros marcadores de uso extendido son Stro-1 y c-kit (CD117). Se ha reportado que estas dianas aparecen sobreexpresadas en células de osteosarcoma resistentes a doxorubicina y aisladas a partir de cultivos de tumorosferas. En este estudio, se evidenció que aquellas subpoblaciones que expresaban ambos marcadores presentaban una mayor capacidad tumorigénica y de generar metástasis en modelos animales además de sobreexpresar dianas relacionadas con fenotipos CSCs como CXCR4 o ABCG2 y presentar una mayor capacidad de generar tumorosferas [269]. Resulta interesante mencionar que se han empleado construcciones celulares con expresión de GFP vinculada a la actividad de los factores de pluripotencia OCT4 y/o SOX-2 en modelos celulares de sarcomas de tejido blando y osteosarcomas[42] [270] De manera similar, se han empleado construcciones con expresión de GFP asociada a hTERT para seleccionar CSCs según su alta actividad

telomerasa [271].

La alta plasticidad de las CSCs y el origen mesenquimal de los sarcomas lleva a que, en algunos casos, la expresión de algún marcador o alguna propiedad funcional asociada a CSCs pueda no coincidir con estos fenotipos o mostrar una expresión diferencial entre diferentes subpoblaciones [24, 31]. Como ejemplo, se han publicado estudios contradictorios con respecto a la expresión del marcador CD49f en subpoblaciones CSCs y se ha reportado

que supoblaciones con expresión positiva del marcador CSCs SSEA-4 eran negativos para ensayos SP, ambos ejemplos en osteosarcomas [272, 273].

### **2.1.3. Metástasis e invasión**

Los sarcomas suelen tener una gran capacidad de metástasis, de manera que aproximadamente la mitad de los pacientes que inicialmente presentan un crecimiento tumoral localizado acabaran generándola; siendo los pulmones la región donde aparecen de manera más recurrente crecimientos neoplásicos secundarios [156]. La mayor parte de los sarcomas migrarán a través de los vasos sanguíneos; sin embargo, los sarcomas epitelioides, los angiosarcomas y los rhabdomyosarcomas alveolares pueden invadir nódulos linfáticos [156]. Tal y como se ha mencionado en apartados anteriores, la migración de células individuales durante la metástasis es característica de células de naturaleza mesenquimal como es el caso de los sarcomas, que pueden circular individualmente o formando una cadena de células [274]. Además, este modelo de invasión puede producirse siguiendo dos mecanismos: el mesenquimal, caracterizado por una morfología celular alargada y la dependencia de la proteólisis de la matriz celular; y el ameboide, con morfología redondeada e independiente de la adhesión y degradación de la matriz extracelular [275].

El modelo mesenquimal involucra la interacción con la matriz extracelular, su remodelación mediante proteasas y la regulación mediada por integrinas [274]. Pese a que en células mesenquimales las adherencias intercelulares y con la matriz son más transitorias que en células epiteliales, la reorganización de las conexiones celulares resulta igualmente clave para el desarrollo de la metástasis [274]. De esta manera, en el inicio de la migración es posible observar transformaciones comparables a la EMT de células epiteliales, en las que la expresión de las N-cadherinas aumenta en detrimento de las E-cadherinas, favoreciendo la formación de esferoides y el crecimiento independiente de anclaje [276]. En relación a lo expuesto, se ha observado que la expresión de marcadores asociados a fenotipos epiteliales, como puede ser la claudina-1 [277], en sarcomas se correlaciona con un mejor pronóstico clínico [276]. Considerando algunos ejemplos, la expresión de N-cadherina y la integrina  $\alpha_9$  se ha asociado con una mayor actividad invasiva dependiente de NOTCH en rhabdomyosarcomas [278]. Esta ruta también juega un papel trascendental en el desarrollo de metástasis en osteosarcomas, donde la regulación por parte de la matriz extracelular es clave [65]. Existen algunas excepciones, a modo de ejemplo, se ha observado que la expresión de

moléculas de adhesión asociadas a la migración mesenquimal como la claudina-11, inhibe la metástasis en varios osteosarcomas [279], al contrario de lo que ocurre en sarcoma de Ewing o en los carcinomas epiteliales [280].

Con respecto al mecanismo de migración ameboide, se ha observado en algunos sarcomas que durante la migración a través del endotelio se produce una transformación del fenotipo mesenquimal a uno ameboide (MAT) [274]. En este modelo juega un papel trascendental la acumulación de phospho-MLC2 dependiente de la ruta de SRC/FAK/Rho/Rock [170]. Citando algunos ejemplos, la migración promovida por una MAT se ha observado en múltiples osteosarcomas y en sarcoma de Ewing [274], donde la inhibición de Rho/Rock inhibe su capacidad de invasión [170, 281, 282]; en liposarcomas mixoides, cuya activación está mediada por la proteína oncogénica de fusión FUS-CHOP [170]; o en fibrosarcomas [274]

El desarrollo de una migración tipo mesenquimal o ameboide depende de las propias características celulares y, en gran medida, del microambiente celular [170, 274, 283].

#### **2.1.4. Microambiente tumoral**

Como en otros tumores, el microambiente celular del sarcoma juega un papel trascendental durante la evolución y propagación neoplásica; generando un nicho protector y proveyendo elementos de señalización pro-oncogénica que afectarán de manera significativa la evolución de la neoplasia, comportamiento de las subpoblaciones CSCs y la respuesta del tumor al tratamiento [284-286]. Las características del microambiente pueden variar según el subtipo histológico del tumor, su posición anatómica, el nivel de complejidad genómica al que se asocia el comportamiento neoplásico, el estado fisiológico del paciente, así como la exposición a tratamientos anti-tumorales [287, 288].

En términos generales, la matriz extracelular de los sarcoma puede estar compuesto de células neoplásicas, células vinculadas al tejido vascular (como células endoteliales o pericitos), células del sistema inmune, otras células no malignas del estroma (por ejemplo, fibroblastos, células madre mesenquimales sanas o, incluso, fibras nerviosas), así como de los propios componentes de la matriz extracelular; siendo muy relevante, además, sus condiciones físico-químicas como la hipoxia o la acidosis [285, 289].

Resulta importante considerar que, dada la naturaleza mesenquimal de los sarcomas, la separación de las células malignas y las células del estroma puede resultar compleja [274]; de hecho, estas células neoplásicas pueden expresar marcadores mesenquimales similares a las células de la matriz como la vimentina,  $\alpha$ -SMA, FSP-1 o FAP- $\alpha$  [290]. Esto, a su vez, influye significativamente en su capacidad para modular el nicho neoplásico. Un claro ejemplo de esto es la estrecha relación que presentan los osteosarcomas con las MSCs, CAFs, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condrocitos, células del sistema inmune infiltradas y otros elementos de la matriz extracelular para promover señalización a favor del mantenimiento del fenotipo “madre” en sus subpoblaciones CSCs [285, 286, 288]. En relación a estas células del estroma asociadas a la neoplasia, se ha evidenciado que las MSCs y CAFs del nicho neoplásico actúan conjuntamente para el favorecimiento del crecimiento tumoral y la metástasis a través de la señalización mediada por PDGF $\alpha/\beta$ , también asociada al mantenimiento del fenotipo CSCs y la resistencia a fármacos [274, 291], o mediante el eje MIF-CXCR4/7, que induce una mayor agresividad tumoral mediante la secreción de exosomas, citoquinas inflamatorias o diferentes moléculas asociadas al metabolismo oncológico [274, 292-296]. De estas dianas, cabe resaltar el papel de CXCR4, cuya expresión se ha reportado en un 67% de los osteosarcomas correlacionándose con la inducción angiogénica mediada por VEGF [297] y, por consiguiente, relacionándose con la aparición de metástasis tanto en osteosarcomas [297] como en rhabdomyosarcomas [298]. CXCR4 interacciona además con SDF1, ambos activados por la expresión de HIF1 $\alpha$  inducida por hipoxia [299]. SDF1 es capaz de favorecer la quimiotaxis a través de las membranas celulares, la adhesión a células endoteliales, clave para la extravasación metastásica, y activar la expresión de MMP-2, asociada al desarrollo de metástasis [300]. Se ha demostrado que las células neoplásicas en cuya membrana se expresa CXCR4 presentan una mayor prevalencia de invasión en órganos donde se exprese SDF1 como la médula ósea [300].

NF $\kappa$ B es otra ruta de señalización importante que puede estar regulada por acción de las células del estroma. Así, se ha observado en osteosarcomas que, en condiciones ácidas, las MSCs asociadas a tumores pueden liberar IL6 induciendo el mantenimiento del fenotipo pluripotente en CSCs y la quimioresistencia mediada por dicha ruta [292]. IL6 también puede intervenir en la señalización de STAT3 incrementando la quimioresistencia de CSCs [301].

Otro ejemplo relevante es TGF- $\beta$ , involucrado en la regulación de proteínas asociadas a la matriz extracelular como es el caso de la osteopontina, proteína secretada a la matriz en múltiples tumores con especial interés como factor pronóstico en osteosarcomas [302]. La expresión TGF- $\beta$  se relaciona con la supresión selectiva del sistema inmune [303], permitiendo, a modo de ejemplo, la generación de un microambiente inmunológico permisivo con el crecimiento tumoral mediante el reclutamiento y diferenciación de sistemas del sistema inmune [286]. Además, se ha reportado que la señalización de TGF- $\beta$ 1 en conjunto con condiciones de hipoxia, induce de manera dramática en osteosarcomas la capacidad de autorenovación en células originalmente no pluripotenciales, incrementando su potencial metastásico, quimioresistencia, tumorigenicidad, y la señalización pro-angiogénica. En este mismo estudio se relacionó el bloqueo de esta diana con el bloqueo de la desdiferenciación y la clonogenicidad celular, así como la capacidad de autorrenovación de CSCs y la desdiferenciación asociada a hipoxia [304]. La promoción angiogénica de TGF- $\beta$  es producida al inducir la sobreexpresión de VEGF y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) [305]. CTGF está relacionado con el desarrollo de metástasis en osteosarcomas induciendo una mayor capacidad de migración celular, sobreexpresión de MMP2/3 y angiogénesis mediada por la expresión en fibroblastos de VEGF [306-309]. Resulta interesante mencionar que, especialmente en condiciones ácidas, los osteosarcomas pueden inducir angiogénesis mediante la liberación al nicho extracelular de exosomas y otras vesículas extracelulares que transportan miRNAs [310]. Otros ejemplos de factores reguladores del estroma incluyen las fibras nerviosas, se ha evidenciado que la axonogénesis puede jugar un papel importante durante la oncogénesis, progresión tumoral y dolor asociado al tumor en fibrosarcomas, osteosarcomas, sarcoma de Ewing, liposarcomas y condrosarcomas de músculo extraesquelético [311-315]. Para acabar, resulta interesante mencionar la importancia del microbioma específico de la región tumoral, del cual se han descrito funciones metabólicas específicas asociadas a determinadas neoplasias [316].

## **2.2. Clasificación de los sarcomas**

Los sarcomas pueden aparecer prácticamente en cualquier región anatómica; por ello, presentan una gran heterogeneidad que se extiende a más de 100 subtipos histológicos diferentes [317]. En términos generales, se suelen agrupar en dos grandes grupos siguiendo un criterio histopatológico: los sarcomas primarios de hueso y los sarcomas de tejido blando

(STS, por sus siglas en inglés). A lo largo de este apartado, se detallarán las principales características de estos dos grupos siguiendo la clasificación mencionada.

### **2.2.1. Sarcomas primarios de hueso**

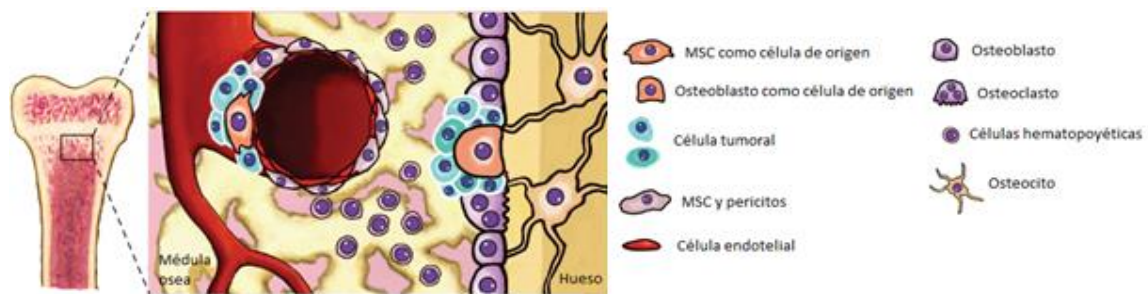
Los sarcomas primarios de hueso comprenden el grupo con menor incidencia global de entre los sarcomas, correspondiendo menos de un 0,2 % de los nuevos diagnósticos de cáncer [210] y un 15% de los sarcomas diagnosticados [210]. Sin embargo, estos tumores aparecen con una frecuencia mucho mayor en poblaciones jóvenes de menos de 20 años [209], de hecho, los sarcomas de hueso ocupan la cuarta posición en muertes pediátricas asociadas a cáncer [4]. La tasa de supervivencia general en este tipo de tumores a 5 años vista varía entre el 50 y el 60%, según la región [210].

Dentro de los múltiples subtipos histológicos en los que pueden clasificarse los sarcomas primarios de hueso, destacan los osteosarcomas, los condrosarcomas (excluyendo las poco frecuentes histologías extraesqueléticas de ambos tumores) y el sarcoma de Ewing.

#### **2.2.1.1. Osteosarcoma**

Los osteosarcomas, el grupo de sarcomas de hueso con mayor incidencia, se caracterizan por ser tumores vascularizados en los que las células neoplásicas generan matriz osteoide de hueso inmaduro [318]. Suelen desarrollarse en la metáfisis de huesos largos, normalmente en las extremidades, generando una masa palpable creciente asociada a dolor [285]. La mayor parte de los osteosarcomas se consideran tumores de alto grado, con un alto potencial metastásico [319]. La mayor parte de los osteosarcomas se diagnostican en pacientes de entre 10 y los 16 años [213], correspondiendo un 5% de las neoplasias malignas pediátricas [317]. Sin embargo, un 30 % de los casos están asociados al envejecimiento apareciendo en mayores de 40 años [317].

Tal y como se muestra en la **Figura 9**, la célula de origen de los osteosarcomas puede ser tanto una MSC como otros tipos celulares más diferenciados a lo largo de la línea osteogénica, incluyendo los osteoblastos. Se ha demostrado que tanto el grado de diferenciación de la célula de origen como el microambiente donde se desarrolla el tumor juegan un papel relevante en el desarrollo del fenotipo de los osteosarcomas [320, 321].



**Figura 9:** Células de origen de los osteosarcomas. En la figura se muestran, además, los tipos de células más representativas del microambiente celular del hueso. **Fuente:** Modificación Abarrategi et al, 2016 [213]

A raíz de lo expuesto, debe considerarse que los osteosarcomas son tumores con una alta inestabilidad a nivel de cromosoma, presentando un cariotipo complejo [209] y mostrando una amplia heterogeneidad genómica dentro de un mismo tumor [322]. En términos generales, las alteraciones genómicas asociadas a este tipo de tumores son muchas, de entre las cuales existen un reducido número una alta recurrencia entre tumores. Las mutaciones relacionadas con la oncogénesis en osteosarcomas más recurrentes aparecen en las proteínas supresoras de tumores TP53 y Rb [31, 323-326] aunque también se han asociado, con una recurrencia significativamente menor, mutaciones en ATRX, PTEN, DLG2, WWOX, RECQL4, CDKN2A, CDK4, MDM2, BCRA1 y 2, IGF1, o NOTCH1 [89, 312, 327-332]. Por otro lado, la activación constitutiva de la ruta de NOTCH también juega un papel clave en el desarrollo de múltiples osteosarcomas, así como en la adquisición de fenotipos CSC actuando, además, de manera sinérgica con la inactivación de p53 [89, 237]. Además, se ha reportado que la adquisición y mantenimiento del fenotipo neoplásico en osteoblastos puede estar dirigida otras rutas también asociadas al fenotipo CSCs como son las rutas de Hedgehog o PI3K; así como por factores de crecimiento como VEGF o FGF [329, 333]. Además, se ha demostrado que Sox2 es capaz de mantener el fenotipo pluripotencial en CSCs de osteosarcomas mediante la inhibición de la ruta Hippo [334]. Otras dianas asociadas al desarrollo y mantenimiento de osteosarcomas, sea a nivel extracelular o mediante señalización extracelular, involucran reguladores del ciclo celular como las ciclinas D1 y E o el regulador de la mitosis AURKB [329, 335]; rutas y factores de transcripción asociados a oncogénesis como MAPK, PI3K, C-Myc, C-Jun o C-Fos [312, 329, 336, 337]; efectores asociados a osteogénesis y remodelación de la matriz extracelular como MET, TWIST, APC, RUNX2, FGFR2, BUB3, BMP o la ruta de WNT [237, 338, 339]; o helicasas como REC1L4, asociada al síndrome de Rothmund Thomson [340].



El inicio y mantenimiento del osteosarcoma puede estar influido, por otro lado, por alteraciones epigenéticas como es la activación mediante la ADN metiltransferasa-1 de SDF-1, relacionada con supervivencia celular y metástasis [341]. Para finalizar, debe mencionarse el importante papel que juega el nicho celular tal y como se ha detallado en apartados anteriores. Los nichos más favorables para el crecimiento de los osteosarcomas son el nicho perivascular, el hipóxico y el endostio [213].

#### **2.2.1.2. Condrosarcoma**

Los condrosarcomas (CDS) se caracterizan por la generación neoplásica de tejido cartilaginoso hialino [139]. Representan el segundo tipo de sarcomas primarios de hueso más común, apareciendo en mayor medida en adultos [342]. En el caso de tumores primarios, suelen aparecer en la cavidad medular del hueso mientras que los secundarios aparecen, además, en la superficie del hueso [139, 317]. En términos generales, se consideran tumores poco agresivos, presentando un buen pronóstico y márgenes quirúrgicos adecuados [317]. Así, un 90% de los condrosarcomas son de grado bajo o medio con una ratio de división, vascularización y potencial metastásico pobres, en gran medida, gracias al efecto barrera que produce la matriz cartilaginosa, que suele ser muy abundante [139, 319]. Sin embargo, resulta importante tener en cuenta que esta matriz extracelular cartilaginosa también actúa como una barrera para la difusión de compuestos, por lo que los condrosarcomas suelen tener respuestas muy pobres a la quimio y radioterapia convencionales, lo cual resulta crítico para aquellas neoplasias metastásicas o localizadas en regiones no accesibles para la resección quirúrgica.

Los fenotipos menos diferenciados en los condrosarcomas son sinónimo de mayor agresividad, como es el caso de los condrosarcomas no diferenciados [139]. Otro ejemplo de ello son los condrosarcomas mesenquimales, un tumor agresivo que histológicamente presenta un fenotipo poco diferenciado junto con islotes de cartílago bien diferenciado. Estos tumores se caracterizan por la proteína de fusión HEY1-NCOA2 [343]. Otros subtipos histológicos de condrosarcomas, en este caso benignos o de grado bajo, son los condrosarcomas de células claras, originados en la epífisis de huesos largos [317] o los condrosarcomas mixoides extraesqueléticos, caracterizados por la proteína de fusión EWSR-NRA3 [139].

Considerando algunas dianas recurrentemente alteradas en condrosarcomas, cabe mencionar IDH1 e IDH2, mutadas en, aproximadamente, un 60% de estos tumores [344]; EXT1/2 [139]; el gen de colágeno cartilaginoso COL2A1 [345]; la ruta de Hedgehog, estrechamente asociada a la condrogénesis mediada por IHH/PTHrP [139]; la ruta PI3K, más común en tumores de grado bajo [346]; los supresores de tumores pRb y p53 [347], así como el promotor P16INK4 silenciado en estos tumores mediante hipermetilación; o HDAC4 o RUNX2, inhibidas mediante miRNAs. Para acabar, algos elementos asociados a mal pronóstico en condrosarcomas son la disrupción del supresor de tumores RUNX3 [348], la inducción angiogénica promovida por VEGF [349] o la alteración en los patrones de expresión de integrinas mediante la sobreexpresión de factores de crecimiento como IGF-1, citocinas y efectores relacionados con la ruta NFκβ [350].

### **2.2.1.3. Sarcoma de Ewing**

Los sarcomas de Ewing ocupan el tercer tipo de tumor primario de hueso más frecuente y el segundo entre los sarcomas óseos pediátricos. Su incidencia muestra un pico de casos diagnosticados entre los 15 y los 19 años [296]. Si bien más de un 80% de estos tumores se desarrollan en tejido óseo, una baja proporción se origina en tejidos blandos. La célula de origen del sarcoma de Ewing aún no está bien establecida, siendo los principales candidatos MSCs de la médula ósea, células madre de la cresta neuronal, o progenitores osteocondrogénicos [296]. En general, son tumores muy agresivos caracterizados por la expresión de un factor de transcripción quimérico generado mediante una serie de translocaciones cromosómicas específicas que involucran la fusión entre proteínas de la familia FET y los factores de transcripción ETS [296]. La proteína de fusión más común es EWSR1-FLI1, expresada aproximadamente en un 85% de los casos; sin embargo, otros miembros de las familias FET (FUS o TAF15) y ETS (e.g. ERG, ETV1, ETV4 o FEV) pueden componer proteínas de quiméricas homólogas mostrando, en términos generales, un fenotipo clínico similar a EWSR1-FLI1 [351]

Al contrario que los osteosarcomas y condrosarcomas, los sarcomas de Ewing están entre los tumores más genéticamente estables que se conocen siendo la translocación cromosómica el principal evento oncogénico. A parte de este evento crítico, sólo unos pocos genes aparecen mutados en una pequeña proporción de pacientes. Entre estos se incluyen algunos asociados a un peor pronóstico clínica y al desarrollo de fenotipos pluripotenciales,

como STAG2 (mutado en un 15-21% de los tumores diagnosticados), en TP53 (5- y7%) y CDN2A (12%) [296, 352].

Las proteínas de fusión asociadas a estos sarcomas tienen la capacidad provocar una reestructuración masiva del transcriptoma permitiendo la expresión aberrante de una gran cantidad de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, migración celular, transducción de señales, estructura de la cromatina o la actividad telomerasa, entre otras funciones [296, 353]. Como ejemplo de las mencionadas reestructuraciones, EWST1-FLI1 puede reclutar los complejos de la remodelación de la cromatina BAF asociados a microsatélites GGAA para provocar una reprogramación epigenética característica de estos tumores [354]. Por otro lado, la regulación genética llevada a cabo por esta proteína de fusión también puede producirse mediante la expresión de determinados RNAs no codificantes [296].

Entre los eventos mediados por la acción de EWST1-FLI1 cabe mencionar la sobreexpresión de CD99, un receptor empleado como marcador diagnóstico y que se asocia a metástasis [355]. Por otro lado, el silenciamiento de BRCA1 producido por la formación de bucles R conduce a la inhibición de PARP, crucial para la activación de mecanismos de activación genómica y la oncogénesis [356]. La proteína de unión a RNA YB1 resulta clave para la resistencia a estrés celular e inducción metastásica, promoviendo la expresión de HIF1 $\alpha$ , así como gránulos de estrés citosólicos [357]. En adición, rutas asociadas a fenotipos CSCs, como PI3K y FAK (en tumores metastásicos), Hedgehog, NOTCH, Hippo o WNT, también aparecen alteradas por la acción de la proteína quimérica en este tipo de tumores [319].

### **2.2.2. Sarcomas de tejido blando**

Los STS representan un heterogéneo grupo de neoplasias mesenquimales malignas que comprende más de 70 subtipos histopatológicos diferentes [317, 358]. Representan, aproximadamente, un 6% de los tumores pediátricos y algo menos de un 1% de los tumores adultos [4, 359]. La tasa de supervivencia a 5 años para STS es aproximadamente del 60%, cayendo hasta un 10-17% en pacientes de alto riesgo [360].

En este apartado se detallarán los subtipos de STS más representativos: los liposarcomas, fibrosarcomas, mixofibrosarcomas, UPS, leiomioma, rabdomiosarcoma y el tumor del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés).

### 2.2.2.1. Liposarcoma

Los liposarcomas comprenden un 20% de los STSs en adultos, presentando el pico de incidencia entre los 50 y los 65 años [361]. En términos generales, estos tumores suelen aparecer en las extremidades a partir de la transformación neoplásica de una célula mesenquimal asociada a la acumulación de mutaciones oncogénicas o a la expresión de determinadas proteínas de fusión producidas por translocaciones aberrantes a nivel de cromosoma como se mostrará más adelante [217, 360]. El origen de estos tumores se ha ligado a etapas tempranas de diferenciación adiposa de MSCs; dependiendo en gran medida de su estado de maduración [362].

Por otro lado, se ha evidenciado la existencia de subpoblaciones con propiedades CSCs a partir varios modelos de liposarcoma, sobreexpresando dianas asociadas a estos fenotipos como SOX2, Nanog y Klf4 [42, 257, 363].

Los liposarcomas incluyen 4 subtipos de tumores lipomatosos:

**Tumor lipomatoso atípico/bien diferenciado:** Tumores en general poco agresivos que pueden surgir en cualquier región, localizándose normalmente en zonas profundas sin generar dolor en el paciente pudiendo alcanzar, con los años, grandes tamaños [364]. Estos tumores, que comprenden el 40-45% de los liposarcomas [317]; se caracterizan por la proliferación neoplásica de células adiposas maduras que, además, muestran variaciones significativas en el tamaño, así como atipia nuclear. Además, pueden mostrar tres tipos morfológicos: adiposo, escleroso o en huso. Este tipo de sarcomas presentan un potencial metastásico y tasa de recurrencia bajos [361]. Resulta importante considerar que un 20% de estos tumores acaban adquiriendo un fenotipo menos diferenciado y ganando potencial metastásico [364]. Los liposarcomas diferenciados suelen presentar amplificaciones a nivel de cromosoma produciendo aberraciones [361]. Las dianas más comúnmente alteradas son CDK4 (95% de los tumores), MDM2 (87%) y HGMA2 (76%) [365]

**Liposarcoma no diferenciado:** Estos tumores comprenden un 15-25% de las histologías de liposarcomas [317]; y se caracterizan por contener una amplia heterogeneidad de poblaciones dentro del tumor, incluyendo células no lipomatosas indiferenciadas [364]. Se consideran tumores de alto grado y, pese a mostrar un potencial metastásico relativamente

bajo (15-20%) [29], muestran una tasa de supervivencia a 5 años de, aproximadamente, el 20% [366].

En términos generales, los liposarcomas no diferenciados presentan marcadores similares a los diferenciados; además de presentar una mayor frecuencia en las alteraciones en el número de copias de genes relacionados con la progresión tumoral. Estas alteraciones se asocian a una mayor inestabilidad genética y a un mal pronóstico clínico [365]. Las alteraciones relacionadas con la progresión del liposarcoma diferenciado al no diferenciado suelen estar asociados a la desregulación de los mecanismos de diferenciación adipogénica [367, 368].

**Liposarcoma mixoide/ de células redondas:** Tumor compuesto de pequeñas células mesenquimales redondeadas, primitivas y no lipogénicas, que se sitúan homogéneamente dispersas en una matriz mixoide que contiene un número variable de células grasas [369]. Además, es posible encontrar una pequeña proporción de células en anillo de sello y lipoblastos multivacuolados [364]. Estos tumores corresponden el 30-35% de los diagnósticos de liposarcomas [317], apareciendo usualmente en tejido blando profundo de las extremidades, especialmente en la musculatura del muslo (más de un 66% de los casos) [317].

La agresividad del tumor depende de su contenido en células redondeadas, de manera que los tumores con poblaciones de células redondas mayores al 5% son considerados de grado alto, con gran capacidad metastásica y una supervivencia a 5 años del 50%. Por otra parte los tumores con baja proporción de células redondas son de bajo grado y presentan una supervivencia a 5 años mayor al 90% [361, 370]. Resulta importante mencionar que estos tumores tienden a metastatizar tejidos poco usuales para los sarcomas sin llegar a invadir el pulmón, como son almohadillas grasas del retroperitoneo o la axila [361, 364]; aunque típicamente generan metástasis en huesos y abdomen [371].

En cuanto a las alteraciones genómicas características de este tipo de tumores, más del 90% de estos tumores presentan una traslocación cromosómica que produce una proteína de fusión entre un miembro de la familia FET, normalmente FUS; y el factor de transcripción homólogo a C/EBP CHOP, también denominado DDIT3 o GADD153 [29, 216, 364, 372]. Esta proteína quimérica resulta clave en la adquisición del fenotipo neoplásico a partir de MSCs, en conjunto con la alteración de otras dianas clave como p53, pRB, TERT (mutado en un 74% de los casos) [373], CMYC o RAS [216, 217, 367]

**Liposarcoma pleomórfico:** Tumores muy agresivos compuestos por un número variable de lipoblastos pleomórficos que comprenden menos del 5% de los liposarcomas diagnosticados [364]. La mayor parte de los liposarcomas pleomórficos surgen en tejido blando profundo en pacientes, normalmente, mayores de 50 años, presentando una mortalidad del 50% [317, 361]

Estas neoplasias son capaces de desarrollar metástasis temprana en más de un 50% de los casos, normalmente hacia el pulmón [361]. Además, presentan una actividad mitótica muy alta, acompañada muchas veces de hemorragia y procesos necróticos [364].

A nivel genómico, estos tumores presentan policromosomías, reordenaciones estructurales complejas, así como múltiples amplificaciones y deleciones en el número de copias [374]

#### **2.2.2.2. Sarcoma pleomórfico no diferenciado**

Grupo heterogéneo de sarcomas pleomórficos que no presentan una línea de diferenciación definida [29, 361, 364]. Por este motivo, estos tumores pueden presentar una amplia variedad de morfologías, características biológicas, pronóstico y respuestas a tratamientos. Estos sarcomas suelen aparecer en las extremidades, especialmente las inferiores, durante la adultez tardía; presentando el pico de incidencia entre los 60 y los 70 años [364]. Además, pueden aparecer como tumores secundarios en tejidos previamente irradiados y, en casos excepcionales, en úlceras crónicas [364].

Se consideran tumores agresivos, con una tasa de mortalidad a 5 años del 65%, mostrando en la mayor parte de casos metástasis temprana hacia el pulmón [364]. Esto está relacionado con la presencia ya evidenciada en estas neoplasias de subpoblaciones CSCs, las cuales mostraban alteraciones en las rutas de NOTCH y Hedgehog [29, 42, 100].

Muchos estudios han reforzado la idea de que el origen más probable de estos tumores son MSCs, ya que estas células son capaces de originar sarcomas pleomórficos indiferenciados cuando se someten a un proceso de transformación tumoral mediante la introducción secuencial de eventos oncogénicos [216, 375]. Además, se ha reportado varias translocaciones asociadas a este tipo de tumores que producen proteínas quiméricas que suelen involucrar PRDM10 [376]. Otras dianas asociadas con la sarcomagénesis en estas líneas incluyen p53 y Ptch1 [29, 377]

### 2.2.2.3. Sarcoma sinovial

Grupos de sarcomas, en general de alto grado, que suelen aparecer en adolescentes y adultos jóvenes [29, 378]. Corresponden el 10% de los STSs diagnosticados, y su pronóstico depende, en gran medida, de las condiciones en las que se puede realizar una resección quirúrgica, la aparición de metástasis, tamaño y localización del tumor [378].

Estos tumores pueden originarse en muchas otras regiones del organismo aunque la mayoría de estos tumores aparecen en las membranas sinoviales y en las cápsulas articulares [367]. Aproximadamente un 70% de los sarcomas sinoviales generan metástasis, especialmente en el pulmón [379].

Estos sarcomas se caracterizan por la expresión de una proteína quimérica producto de una translocación cromosómica, que involucra el factor de transcripción SYT con la familia de represores SSX. La proteína de fusión resultante puede actuar como un modificador epigenético estrechamente regulado por el contexto celular [380]. El elemento SSX dentro de la proteína quimérica determinará el subtipo histológico del sarcoma. Así, SSX1 se asocia a histologías bifásicas en las que se pueden observar en cantidades similares de células neoplásicas de aspecto fibroso y células con morfología similar a las células epiteliales. Por otra parte, la presencia de SSX2 se asocia con histologías monofásicas, con presencia casi exclusiva de células de aspecto fibrótico formando láminas. Por último, las translocaciones con SSX4 son muy poco comunes y están asociadas a tumores poco diferenciados cuyas células similares a las del sarcoma de Ewing [367, 381]. Los tumores monofásicos presentan una peor pronóstico y, pese a que estos sarcomas en general no presentan una gran inestabilidad genética, presentan mayor cantidad de aberraciones genómicas [367, 382]. En cuanto a los bifásicos, la expresión de marcadores epiteliales en las células asociadas, como ERBB2, IGFBP2, E-cadherina o cateninas; se ha relacionado con una mejor pronóstico clínico [367].

Para finalizar, se debe mencionar que el silenciamiento de la proteína de fusión SYT-SSX ha permitido la diferenciación condrogénica, osteogénica o adipogénica en subpoblaciones de sarcomas sinoviales, lo que reafirma su posible origen en MSCs [383] además de aportar evidencias sobre la existencia de CSCs en estos tumores [384]. En este sentido, se han aislado en estos tumores subpoblaciones celulares con características CSCs con alta expresión de Sox2, Ocy4 y Nanog [383].

#### 2.2.2.4. Leiomioma

Estos tumores pleomórficos característicos del músculo liso representan un 25% de los STSs [29]. Inciden normalmente en extremidades, intestino delgado y espacios retroperitoneales, especialmente en el útero; de pacientes de mediana edad [385]. Las características de estos tumores dependen en gran medida de su localización en el organismo [386]; siendo especialmente agresivos y resistentes a los tratamientos los que se desarrollan en el útero [387]. En términos generales, la supervivencia de estos tumores a 5 años es del 40%; bajando a un 10-15% en tumores agresivos y al 15-25% en tumores uterinos [387]. Además, estos tumores presentan un alto potencial de generar recidivas (40% a 5 años), lo cual se asocia a una amplia tasa de mortalidad [367].

Los leiomiomas se caracterizan por presentar una gran inestabilidad genética con múltiples aberraciones de número y estructura a nivel cromosómico. Las más comunes afectan a las regiones de PTEN y RB1, y están asociadas a un peor pronóstico [29, 367]. En relación a esto, la activación constitutiva, o mediada por la inactivación de PTEN, de la ruta PI3K resulta trascendental para la sarcomagénesis en este tipo de tumores [388]. Otras alteraciones recurrentes asociadas a una mayor progresión tumoral afectan al silenciamiento epigenético de CDKN2A, lo que reduce la expresión de P16INK4A y P14ARF; e incrementa MDM2 y CDK4/CDK6 [389].

#### 2.2.2.5. Rabdomioma

Los rabdomiomas representan el grupo de STS más común en pacientes pediátricos y adultos jóvenes; aunque pueden debutar a cualquier edad [390]. Se cree que se originan a partir de precursores miogénicos que pierden la capacidad de diferenciarse a músculo esquelético [391]; apareciendo normalmente en cabeza y cuello, extremidades o tracto genitourinario [392]. Estos tumores presentan un desarrollo agresivo con altas tasas de invasión local y una alta propensión al desarrollo de metástasis, especialmente a médula ósea, pulmón y hueso [378].

Los rabdomiomas presentan dos grandes subtipos histológicos:

**Rabdomioma alveolar:** Tumores poco diferenciados que aparecen prevalentemente en adolescentes y adultos jóvenes [29]. En general se comportan de una manera agresiva con un alto potencial metastásico; presentando tasas de supervivencia a 5 años del 30% [393].



En un 80% de los casos, estas neoplasias se caracterizan por translocaciones cromosómicas que generan la proteína de fusión PAX-FOXO1, un factor de transcripción hiperactivo que, normalmente, contiene los factores PAX3 o PAX7 [393]. Los tumores caracterizados por la expresión de PAX3-FOXO1 se asocian con un pronóstico significativamente peor, siendo a día de hoy tumores intratables terapéuticamente [393, 394]. La sarcomagénesis en estos tumores no depende únicamente de la proteína de fusión. Así, se ha reportado alteraciones que apoyan el desarrollo neoplásico como alteraciones en la ruta Hippo, la disrupción de INK4 $\alpha$  o la sobreexpresión de CDK4, n-MYC o MIR17-19 [367, 393].

**Rabdomiosarcoma embrionario:** Estas neoplasias presentan un pronóstico más favorable que las alveolares, con tasas de supervivencia alrededor del 70% [367], y suelen incidir en menores de 10 años [29]. Los rabdomiosarcomas embrionarios presentan una cantidad de mutaciones somáticas significativamente superior a los alveolares caracterizados con la proteína de fusión. Entre ellas, cabe destacar mutaciones asociadas a las rutas PI3K, WNT, NF-1, RAS, P53 y Hedhehog [29, 367]. Resulta interesante mencionar que se han logrado aislar varias subpoblaciones con características CSC a partir de estos tumores [29].

Más allá de la histopatológica, existen otras clasificaciones que pueden resultar de ayuda a la hora de caracterizar y frenar la evolución neoplásica en un paciente. En este contexto, cabe destacar la clasificación según el estado del tejido en el que aparece el sarcoma, considerando tumores primarios como aquellos que se originan a partir de tejidos sanos sin patologías previas; y tumores secundarios como los que crecen en tejidos previamente expuestos a factores o lesiones potencialmente pro-oncogénicas, como puede ser la radioterapia [213].

### 2.2.3. Otras clasificaciones de los sarcomas

Otra clasificación relevante es aquella que considera la complejidad de los defectos genéticos que acaban conduciendo al desarrollo del sarcoma. Según esta clasificación, se establecen, por un lado, los sarcomas con defectos simples en el cariotipo, aquellos que involucran translocaciones o inversiones en el cromosoma, así como mutaciones activadoras específicas de una neoplasia en cuestión, provocando así un comportamiento aberrante tanto a nivel genómico como proteómico por parte de la célula tumoral [209]. Por el otro lado, se consideran los sarcomas desarrollados a partir de alteraciones complejas en el cariotipo, como pueden ser reordenamientos del cromosoma, que provocan una amplia inestabilidad

genómica y la disrupción del ciclo celular. Este grupo muestra una incidencia significativamente mayor que el primero en pacientes adultos e incluye a los tumores secundarios; además, suelen presentar alteraciones recurrentes en pRb, p53 y/o MDM2 [209]. Esta clasificación junto con ejemplos de sarcomas asociados a cada uno de los grupos se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Tipos de sarcoma según complejidad genética. **Fuente:** Modificación Hui et al, 2016 [209]

Alteraciones genéticas	Ejemplo de sarcoma
Defecto simple en el cariotipo <ul style="list-style-type: none"> <li>• Traslocación en el cromosoma específica de neoplasia</li> </ul>	Sarcoma de Ewing
	Rabdomiosarcoma alveolar
	Sarcoma sinovial
	Dermatofibrosarcoma protuberante
	Tumor de células
	Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas
	Liposarcoma mixoide
	Leiomiosarcoma
	Liposarcoma desdiferenciado
	UPS
Defecto complejo en el cariotipo <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inestabilidad genética</li> <li>• Alteración del ciclo celular</li> </ul>	Osteosarcoma
	Angiosarcoma
	Tumor maligno periférico de la vaina nerviosa

### **2.3. Tratamiento de los sarcomas**

En lo que respecta a tumores localizados, los múltiples avances en el tratamiento del cáncer alcanzados en los últimos años han permitido aumentar de manera significativa las tasas de supervivencia. Sin embargo, en neoplasias más avanzadas como las asociadas a la aparición de metástasis o recidivas, los niveles de mortalidad han permanecido prácticamente inalterados durante las últimas décadas [395], de manera que aproximadamente una tercera parte de los pacientes de sarcomas no llegan a superar el cáncer [288].

En este apartado se detallarán los diferentes procedimientos establecidos para el tratamiento de sarcomas, así como algunas de las principales terapias recientemente desarrolladas con potencial para su futura aplicación clínica.

### **2.3.1. Terapias establecidas**

En términos generales, el tratamiento de neoplasias localizadas en tumores de hueso se realiza mediante la eliminación quirúrgica del tumor seguida de quimioterapia combinatoria neoadyuvante. Los agentes más empleados en para el tratamiento de osteosarcomas u condrosarcomas son la doxorubicina, la ifosfamida, el cisplatino y el metotrexato a altas dosis [317, 318, 396]. En casos más agresivos en los que la respuesta al tratamiento es pobre o en los que se han desarrollado metástasis, la aproximación más común es la eliminación de los tumores visibles y la combinación de etopósido con ifosfamida [318, 396]. En sarcoma de Ewing, el tratamiento quimioterapéutico se compone de vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida, o de la combinación de etopósido con ifosfamida [396]. En condrosarcomas, debido a la matriz cartilaginosa, los tratamientos con quimio y radioterapia suelen ser poco efectivos [139].

En casos complejos en los que la extirpación quirúrgica presenta complicaciones, sea porque el tumor se localice en una región inaccesible, porque los márgenes de la escisión quirúrgica no estén bien definidos, o porque el paciente no puede ser operado, el tratamiento consta de altas dosis de radioterapia (radiación fotónica) en combinación con quimioterapia agresiva. Debe tenerse en cuenta que la respuesta de los osteosarcomas a la radioterapia suele ser baja [318]. Con respecto a los STSs, el tratamiento de tumores localizados se basa en la resección quirúrgica apoyada, normalmente, con radioterapia pre y/o postoperatoria, lo que permite controlar y limitar los límites de la resección [397]. En el caso de que la cirugía no sea realizable, la primera opción es el empleo de radioterapia pudiendo emplearse a altos niveles también como aproximación paliativa [397].

En términos generales, el uso de quimioterapia se reserva a tratamientos sistémicos en tumores metastásicos o no extraíbles quirúrgicamente, siendo muchas veces un tratamiento paliativo. Sin embargo, dentro de los múltiples subtipos de STSs existen tumores que suelen ser sensibles a quimioterapia como son los sarcomas sinoviales, algunos liposarcomas pleomórficos, los liposarcomas mixoides o el rhabdomiosarcoma pediátrico [397]. En estos casos, la combinación más empleada es doxorubicina, individualmente o en combinación

con ifosfamida, aunque los liposarcomas mixoides también responden de manera adecuada a la trabectedina [398]; además, los angiosarcomas presentan sensibilidad a varios fármacos de la familia de las antraciclinas, como la doxorubicina; y a taxanos, como el paclitaxel [397, 399]. Resulta interesante mencionar que existen algunos sarcomas para los que se han podido desarrollar terapias dirigidas con buenos resultados. Un buen ejemplo GIST. Una gran mayoría de estos tumores presentan mutaciones KIT o en PDGFRA, por lo que son susceptibles para el tratamiento dirigido con inhibidores de las tirosin kinasas. De hecho, se han logrado grandes resultados en el tratamiento de pacientes con GISTs avanzados con el inhibidor Imatinib [288].

Es importante mencionar que el empleo de quimioterapia, especialmente en los tratamientos más agresivos, puede producir toxicidad aguda o a largo plazo en tejidos sanos del paciente. Considerando algunos ejemplos de mayor relevancia, se ha demostrado que las antraciclinas como la doxorubicina son altamente cardiotóxicas [400]. Por otro lado, los tratamientos basados en platino como el cisplatino muestran altas tasas de toxicidad renal, hepática, pérdida de cabello o hipomagnesemia [401]. Con respecto al metotrexato, su uso se ha asociado con nefropatías, desarrollo de esterilidad y leucemias [318].

### **2.3.2. Terapias en desarrollo**

Como se ha explicado en apartados anteriores, las características de los sarcomas hacen que los procedimientos clínicos vigentes tan solo resulten parcialmente efectivos. Los avances en el tratamiento del cáncer a lo largo de los últimos años han abierto la puerta a nuevas aproximaciones para su tratamiento, algunas de las cuales han mostrado resultados prometedores.

**Medicina personalizada:** Son muchos los estudios que evidencian la importancia de la integración de los datos clínicos y la caracterización del genoma, transcriptoma y epigenoma específicos del paciente y del tejido neoplásico, a la hora de decidir el tratamiento de un tumor, así como alcanzar un diagnóstico y pronóstico más fiables [288, 402]. En lo relativo al tratamiento de sarcomas, la gran variabilidad de histologías y la alta heterogeneidad existente dentro de una misma lesión neoplásica ha dificultado considerablemente la identificación de dianas específicas en los diferentes ensayos clínicos llevados a cabo tanto en STSs [403] como en sarcomas óseos como el sarcoma de Ewing [404] o los osteosarcomas [405]. A pesar de esto, el uso de medicina de precisión aplicada al diagnóstico

y tratamiento de sarcomas ha arrojado algunos resultados importantes. Por ejemplo, la caracterización genómica ha permitido la reclasificación de aproximadamente un 13% de los sarcomas diagnosticados, conduciendo a un cambio en el tratamiento o el pronóstico en un 11% [406]. Con la intención de obtener nuevos avances en la terapia de los sarcomas, actualmente se están llevando varios ensayos clínicos que integran el estudio de este tipo de tumores, como es el ejemplo de MULTISARC, en el que se analizará la respuesta en pacientes de STSs a 16 agentes diferentes y se secuenciarán 500 muestras en busca de mutaciones oncogénicas potencialmente atacables [288]. Otro ejemplo de ensayo clínico de relevancia en sarcoma es NCI-MATCH que, involucrando a unos 6000 pacientes mayores de edad con diversos tumores caracterizaron unos 255 sarcomas [405].

**Terapia fotodinámica:** Esta terapia se basa en inyectar al paciente un compuesto fotosensibilizador que tenderá a quedarse retenido en el tejido tumoral gracias a las condiciones características de estas lesiones como puede ser la acidificación del microambiente celular. Al exponerse a luz, este compuesto tenderá a producir ROSs que producen la muerte de las células del entorno. El uso de naranja acridina como compuesto fotosensibilizador para el tratamiento de sarcomas ha demostrado buenos resultados en varios estudios mostrando una gran selectividad contra tejido neoplásico y baja toxicidad sistémica para el paciente [288, 407, 408]. El uso de esta terapia ha alcanzado fase clínica para el tratamiento de tumores de alto grado incluidos sarcomas no extirpables [408].

**Terapia inmunológica:** El tratamiento del cáncer mediante la activación de la respuesta inmune contra el tumor ha experimentado avances significativos en los años recientes. Una de las estrategias se basa en el uso de fármacos que bloquean la unión de las llamadas proteínas “checkpoint” con sus respectivos receptores, lo que mantiene activados a los linfocitos T contra las células tumorales. Se ha reportado que muchos sarcomas presentan un perfil de mutaciones alto en estas proteínas [409], lo cual está asociado un mal pronóstico clínico tanto en STSs como en sarcomas primarios de hueso [288, 409-411]. En base a lo expuesto, caben destacar dos de estas proteínas: PD-L1, ligando de muerte celular programada expresado por células neoplásicas para evitar la señalización de muerte mediada por los linfocitos T; y CTLA-4, receptor expresado por las células T que juega un papel clave en su inactivación. El uso de inhibidores para estas dos proteínas en el tratamiento de sarcomas se encuentra en fase de estudio clínica [412]. Además, se ha correlacionado los niveles de infiltración de células inmunes con la respuesta a terapia anti PD-L1 en varios

sarcomas [413]. Otro procedimiento relacionado con la terapia inmunológica es la generación de células T genéticamente modificadas de manera que se mejore su capacidad de respuesta ante poblaciones neoplásicas. Se puede encontrar un claro ejemplo en el tratamiento de sarcomas sinoviales mediante linfocitos T que expresaban un receptor de células T con una afinidad mejorada contra el antígeno de peptídico derivado de NY-ESO-1, y que ha mostrado una alta capacidad supresora del tumor [414]. Una de las principales estrategias diseñadas para la generación de linfocitos T con mayor capacidad de respuesta antitumoral es la expresión de un receptor quimérico que contiene la región activadora del receptor de células T y un receptor antigénico específico generado contra antígenos oncológicos con mayor afinidad que los receptores generados en base al complejo mayor de histocompatibilidad [288, 415]. Si bien muchos sarcomas presentan una nula o muy baja expresión de epítomos específicos de fenotipos tumorales, el uso de linfocitos T expresando CAR ha logrado desencadenar una respuesta inmune potente contra estos tumores [409, 415]. Otra estrategia relacionada con la terapia inmunológica aprovecha el aumento significativo de infiltración inmunológica observado en regiones donde se desarrollan recidivas o metástasis en sarcomas óseos, para establecer un tratamiento basado en el uso de células inmunes que previamente han sido expandidas y activadas contra el tumor [416]. De esta manera, se están llevando a cabo varios ensayos en fase clínica II en lo que se intenta tratar varios sarcomas con linfocitos T previamente expandidos y entrenados *ex vivo*, con prometedores resultados [288]. De manera similar, se ha obtenido una respuesta antitumoral significativa en varios modelos preclínicos de rhabdomyosarcomas avanzados [417] y osteosarcomas [418] mediante la infusión de células NK. Resulta interesante mencionar que actualmente existe un ensayo clínico en desarrollo para el tratamiento de sarcomas, NKEXPSARC, focalizado en esta estrategia [288].

**Virus oncolíticos:** A lo largo de la última década, el uso de partículas víricas programadas para infectar de manera específica células neoplásicas como tratamiento del cáncer ha demostrado tener un enorme potencial. En lo relativo al tratamiento de sarcomas, se han conseguido grandes resultados para diferentes subclases de estos tumores [288, 419, 420]. A modo de ejemplo, la exposición a viroterapia en líneas de sarcoma de Ewing mostró un efecto supresor del tumor y aumento la sensibilidad al tratamiento con trabectedina [421]. En esta línea, el tratamiento de osteosarcomas en modelos animales con los adenovirus oncolíticos VCN-01 y  $\Delta$ -24-RGD de replicación supeditada a la expresión de Rb

(sobreexpresada en estos tumores), mostró tener una gran actividad oncosupresora incluso contra metástasis pulmonares, además de sensibilizar el tumor al tratamiento con cisplatino [288, 422, 423]. Sin embargo, pese a que la efectividad del tratamiento de estos ensayos *in vitro* denota el potencial de la viroterapia en sarcomas, los buenos resultados del uso directo de virus oncolíticos no se han logrado extrapolar a los ensayos clínicos cuando se han testado contra sarcomas de Ewing u osteosarcomas [424-426].

Una estrategia interesante para mejorar la respuesta a los virus oncolíticos y reducir la toxicidad asociada a los mismos, es el uso de vehículos celulares con capacidad de migrar a la región neoplásica cargados con virus oncolíticos. En este ámbito, varios estudios han empleado MSCs cargadas con virus oncolíticos dada su capacidad para migrar hacia tumores sólidos y áreas inflamadas [427]. Un claro ejemplo de este tipo de aproximaciones es “Celyvir”, MSCs infectadas con adenovirus oncolíticos ICOVIR-5 que han llegado a testarse en ensayos clínicos con resultados satisfactorios para el tratamiento de diferentes tipos de tumores como neuroblastomas avanzados o, en estudios más recientes aún en fase temprana, diferentes histologías de sarcomas [428-431]. Además de dirigir la acción de los virus oncolíticos en la región neoplásica, se demostró que el tratamiento con Celyvir potenciaba la respuesta inmune próxima al tumor favoreciendo la actividad oncosupresora [429-431]. Resulta interesante mencionar que se ha logrado potenciar la actividad de Celyvir contra osteosarcomas en modelos murinos mediante la administración previa a cada tratamiento del factor estimulante de colonias de granulocitos con el fin de inducir una mayor infiltración de células del sistema inmune asociada a la inyección con las MSCs infectadas [432]. Investigaciones recientes también han logrado obtener buenos resultados para el tratamiento de STSs caninos en modelos animales mediante el tratamiento con virus oncolíticos transportados en MSCs, constantando el enorme potencial de esta técnica para el tratamiento de sarcomas [433, 434].

### **3. Estrategias terapéuticas en sarcomas**

Tal y como se ha expuesto en apartados anteriores, los sarcomas que manifiestan estados avanzados y/o complicaciones que dificultan su resección quirúrgica, suelen estar asociados un mal pronóstico clínico. El tratamiento de gran parte de estos tumores se focaliza en el empleo de agentes citotóxicos que no siempre son efectivos siguiendo, en muchos casos, una finalidad principalmente paliativa [319, 360].

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de sarcomas. Para completar la sección de Introducción, resulta necesario comentar algunos aspectos teóricos complementarios al compendio de publicaciones incluidos en esta Tesis. Así pues, en este apartado se presentarán bases teóricas sobre las que se sostienen las diferentes estrategias dirigidas a la mejora del tratamiento de sarcomas contempladas en este compendio.

#### **3.1. Inhibidores multiquinasas**

Las quinasas representan un amplio grupo de enzimas con capacidad de añadir grupos fosfato (fosforilar) a otras proteínas consumiendo ATP en el proceso. Estas enzimas están involucradas en la modulación de una gran cantidad funciones celulares, habiéndose identificado aproximadamente unas 538 quinasas diferentes en el genoma humano [435]. Una alteración en la actividad reguladora de las quinasas puede estar asociada, en muchos casos, al desarrollo de neoplasias [436, 437]. Sin embargo, resulta importante tener en cuenta que el comportamiento disfuncional de estas proteínas también está vinculado a otras patologías no neoplásicas [436].

Dada la relación entre actividad quinasa y la oncogénesis, a lo largo de las últimas décadas se han llevado a cabo múltiples estudios centrados en el uso de inhibidores específicos de estas dianas como tratamiento para el cáncer. De hecho, un cuarto de las investigaciones desarrollo relacionadas con la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales involucran inhibidores de quinasas [436], como es el caso del inhibidor multiquinasa regorafenib, que actualmente se esta evaluando en fase clínica 2 para el tratamiento de varios sarcomas, especialmente osteosarcomas avanzados [438]. La investigación sobre este tipo de compuestos empezó en los años 70 [439], siendo la estaurosporina, un antifúngico natural de la familia de los indolocarbazoles alcaloides generado por actinomicetos con capacidad



para inhibir PKC [440], el primer inhibidor destacado a partir del cual se comenzaron a diseñar inhibidores sintéticos [436]. Más adelante, a principios de los 2000, se aceptó por primera vez el uso clínico de un inhibidor de quinasas, el imatinib, para el tratamiento de leucemia mieloide crónica [441] abriendo la puerta a la aceptación clínica de otros muchos inhibidores en los años posteriores [436].

Resulta interesante mencionar que en la actualidad se siguen diseñando compuestos inhibidores a partir de la estructura de la estaurosporina mediante la modificación con ingeniería genética de las rutas de biosíntesis del compuesto [442]. Un ejemplo de ello es la midostaurina (o PKC-412), un inhibidor multiquinasa con capacidad de bloquear FLT3 y PKC, cuyo uso clínico está indicado en combinación con quimioterapia clásica para el tratamiento de pacientes de leucemias mieloides agudas que presentan mutaciones en FLT3 [443]. Sin embargo, los avances recientes en técnicas de análisis estructural a nivel molecular han abierto nuevas posibilidades en el diseño de estos compuestos [444]. Además, aunque el uso de moléculas de bajo peso molecular es la aproximación más estandarizada, también se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra receptores en rutas de señalización de quinasas como son el cetuximab para el tratamiento de cáncer colorrectal y tumores de cabeza y cuello [445]; o el trastuzumab contra HER-2 para tratar tumores de mama [446]

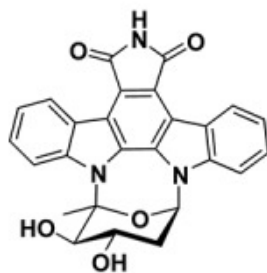
En relación a lo expuesto, cabe destacar algunas de las quinasas de mayor interés a la hora de dirigir el tratamiento, como son PI3K, EGFR, BRAF o las quinasas aurora; cuya sobreexpresión se ha asociado a la oncogénesis, crecimiento tumoral y metástasis, así como a la activación de mecanismos de supervivencia celular [436, 447, 448]. Dentro de las mencionadas, cabe destacar la relevancia que las quinasas aurora están cobrando en los últimos años, las cuales han mostrado capacidad para sobreactivar la ruta de señalización NF- $\kappa$ B y de inhibir la regulación mediada por p53 [436, 449, 450].

Pese a los múltiples éxitos asociados al uso de los inhibidores de quinasas para el tratamiento del cáncer, estas terapias aún presentan algunas limitaciones importantes. La más significativa de estas reside en la resistencia que muchos tumores acaban adquiriendo frente al tratamiento [436, 451-453]. Por otro lado, aunque suelen presentar una menor toxicidad sistémica que la quimioterapia convencional [436, 437, 454], el tratamiento con inhibidores de quinasas no está exento de provocar efectos secundarios entre los que se incluyen toxicidad cardiovascular, hipertensión, alteraciones en la piel y proteinuria [455].

Una estrategia para evitar las limitaciones expuestas parte del uso de inhibidores con capacidad de inhibir más de una diana de manera que su efecto antitumoral se vea potenciado a la vez que se reducen las posibilidades de generar resistencias [456]. La mayor parte de los inhibidores multiquinasas usados en clínica actualmente fueron caracterizados como inhibidores de una única diana en los que, a posteriori, se identificó la capacidad de bloquear objetivos alternativos [454]. Destacando algunos ejemplos sobre el uso de estos inhibidores en clínica, se puede mencionar el Imatinib, inhibidor de PDGFR, la quinasa Bcr-Ab1 y c-Kit para el tratamiento de varias histologías de leucemia, dermatofibrosarcomas protuberantes o GITSs [454, 457]. Otro ejemplo interesante es el Sorafenib, un compuesto capaz de inhibir VEGFR, PDGFR, BRAF, FTL3, RET o c-Kit que se ha aprobado para el tratamiento de cáncer de tiroides, carcinomas hepáticos avanzados y metástasis de carcinomas de células renales [458]. Las mismas dianas son inhibidas por el Cabozantinib, permitido para el tratamiento de carcinomas medulares de tiroides avanzados y metástasis derivados de carcinomas renales [454, 459]; y el Regorafenib, usado en clínicas contra neoplasias avanzadas de GIST, carcinomas hepáticos y cáncer colorrectal [460].

### 3.1.1. El EC-70124

El EC-70124 es un inhibidor multiquinasasa generado a partir de la hibridación de los genes relacionados con la biosíntesis del inhibidor multi-quinasa estaurosporina y de la rebecamicina, un inhibidor de la ADN topoisomerasa I, en una cepa originalmente no productora de este de estos compuestos, *Streptomyces albus* [461]. En la **Figura 10** se muestra la estructura molecular del EC 70124.



**Figura 10:** Estructura molecular del EC-70124. Fuente: Cuenca-López et al, 2015 [462]

En términos generales, el EC-70124 ha mostrado un elevado potencial como agente antitumoral contra diferentes tumores, presentando una capacidad inhibitoria para quinasas relacionadas con el desarrollo neoplásico incrementada con respecto a la estaurosporina.

Además, este compuesto también produce daños significativos a nivel de ADN en las células tumorales [461-463]. La capacidad antitumoral del EC-70124 se ha ensayado en distintos en modelos preclínicos de cáncer. En células de cáncer de mama provocó la disrupción de las rutas PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT que tuvo como resultado el bloqueo en células neoplásicas en la fase del ciclo celular G2/M y un incremento significativo en el daño en el ADN[462]. Un efecto similar se observó en modelos preclínicos de tumores colorrectales [463, 464]. Por otro lado, el tratamiento con EC-70124 sido capaz de revertir la oncogénesis y afectar a las subpoblaciones CSCs en cáncer de próstata, mediante un mecanismo donde se induce la desactivación de NF- $\kappa$ B mediada por la inhibición de STAT3 [465]. En relación a esto, se ha reportado que la inhibición de NF- $\kappa$ B resulta clave en el efecto antitumoral del fármaco contra algunos carcinomas nasosinusales [466] y glioblastomas [467]. El EC-70124 también ha mostrado un potente efecto anti-tumoral en modelos preclínicos de leucemia mieloide aguda, evidenciando un gran potencial inhibidor de FLT3 y las quinasas PIM [468]. Aunque ensayados en menor profundidad, este fármaco también ha presentado respuesta antitumoral contra líneas celulares de melanoma, gliomas y tumores neuronales [467]. Resulta interesante mencionar que el tratamiento combinado de EC-70124 y quimioterapia clásica en modelos preclínicos de carcinoma de colon y cáncer de mama ha mostrado una interacción anti-tumoral sinérgica [462, 464].

Tal y como se verá en capítulos posteriores, el primer artículo contenido en este compendio intentará caracterizar el mecanismo de acción del EC-70124 en varios modelos de sarcomas, a la vez que pone a prueba su potencial anti-tumoral como parte de una terapia combinada con doxorubicina.

### **3.2. Nanotransportadores: Encapsulación de agentes citotóxicos**

El uso de agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer debe enfrentar determinadas barreras fisiológicas que limitan en gran medida su capacidad de acción sobre el tejido neoplásico, haciendo necesario el uso de altas dosis de fármacos e incrementando los efectos adversos asociados al tratamiento [469]. Si bien en condiciones normales estas barreras resultan claves para la defensa contra elementos potencialmente dañinos, pueden dificultar biodistribución del fármaco hacia el nicho tumoral induciendo una mayor actividad citotóxica inespecífica en regiones sanas [470, 471]. Por otro lado, el tiempo de vida media de los diferentes compuestos en el organismo suele ser considerablemente bajo, siendo la

filtración renal y la actividad hepática claros ejemplos de elementos que intervienen directamente en la eliminación sistémica del compuesto antitumoral [471, 472]. Otras limitaciones asociadas a la administración de fármacos incluyen la baja solubilidad en agua de muchos agentes citotóxicos o la sensibilidad de estos a determinadas condiciones fisiológicas asociadas al tumor como el pH ácido (lo que hace necesaria añadir a la formulación excipientes que pueden resultar tóxicos para el organismo) [470].

Desde que el célebre físico Richard Feynman formulara su discurso “There’s plenty of room at the bottom” a finales de los años 50 [473], la investigación en el campo de la nanotecnología y, por consiguiente, el uso de nanomateriales en el ámbito científico y tecnológico ha experimentado un importante desarrollo; abriendo nuevas posibilidades, entre otras muchas aplicaciones, dentro de la terapia oncológica. La conjugación de compuestos mediante la funcionalización (unión covalente a la superficie de la partícula a modo de cobertura) o encapsulación de los mismos en transportadores nanométricos, cuya relación superficie/volumen es muy alta, ha permitido modificar sus características físicas y las vías de interacción con el entorno en que se encuentran; mejorando así la eficacia terapéutica a la vez que se reduce el efecto citotóxico en tejidos sanos [469, 474]. Partiendo de lo expuesto, compuestos de naturalezas completamente diferentes pueden encapsularse en nanotransportadores de características modulables, de manera que sea posible mejorar y controlar los parámetros farmacocinéticos del agente en el organismo, así como evitar el uso de excipientes tóxicos en el caso de moléculas poco solubles en agua [470]. Además, la encapsulación del tratamiento en diferentes nanovehículos puede abrir la puerta al empleo de vías de administración alternativas para fármacos usualmente administrados por vía venosa; como pueden ser la vía oral, nasal, intraocular o parenteral [475].

Debe tenerse en cuenta que el uso de nanomateriales aún presenta algunas limitaciones relacionadas en la mayor parte de los casos con cuestiones técnicas como la alta complejidad y coste de su preparación a nivel industrial, la inestabilidad a medio plazo de muchos nanomateriales y la posible alteración de los compuestos bioactivos administrados al interaccionar con el nanotransportador [475, 476]. Además, aún hay mucho por esclarecer con respecto a las interacciones de los nanomateriales con el organismo.

Entre los múltiples nanomateriales con potencial para actuar como transportadores en el organismo, este compendio se focalizará en el estudio de nanovehículos de naturaleza

orgánica. A lo largo de este apartado, se detallarán algunos de los parámetros asociados a las propiedades de los representantes más relevantes de este tipo de nanotransportadores y se profundizará en los mecanismos que hacen que estos sean tan importantes a la hora de transportar el agente citotóxico al entorno neoplásico.

### **3.2.1. Claves para la administración mejorada de fármacos**

La biocompatibilidad, características y comportamiento de los nanotransportadores dependen, en gran medida, de la naturaleza y formulación de sus componentes, junto a los parámetros escogidos durante su preparación [477]. Por otro lado, también pueden estar influidas por la interacción con elementos encapsulados o que se conjugan a su superficie [478]. El estudio de la influencia de estos elementos sobre las propiedades de los nanotransportadores resulta clave para el diseño de vehículos óptimos para la administración y correcta biodistribución de agentes citotóxicos contra el tumor.

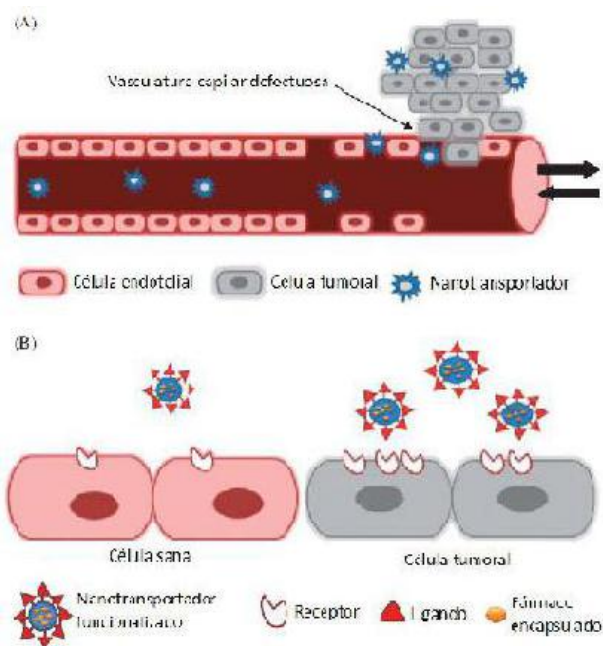
Considerando algunos de los parámetros que deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar un nanotransportador; en primer lugar, se debe mencionar el tamaño de la partícula, cuya importancia se detallará en mayor profundidad en el siguiente apartado. Este parámetro, comúnmente medido con el diámetro hidrodinámico del nanomaterial, se relaciona directamente con la biodistribución del agente citotóxico y con el tiempo de vida media del transportador en el organismo [479, 480]. En relación al tamaño debe mencionarse el índice de polidispersidad (PDI), que hace referencia a la dispersión de la variedad de tamaños en las nanopartículas de una muestra [481]. La técnica más comúnmente empleada para medir estos dos parámetros es la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), la cual se basa en la medida e integración de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada con el tiempo de un haz de laser que incide sobre las partículas analizadas. La velocidad de estas fluctuaciones está directamente relacionada con el movimiento Browniano que depende a su vez del tamaño de la nanopartícula (mayor y más amplio a menores tamaños y viceversa). En cuanto al PDI, medido a partir de la función de dispersiones medidas por DLS en una muestra, se suele tomar como referencia que valores superiores a 0,4 corresponden a muestras polidispersas, entre 0,1 y 0,4 moderadamente monodispersas e inferiores o iguales a 0,1 altamente monodispersas [482]. Resulta importante mencionar que la medida del  $R_H$  puede no coincidir con las medidas obtenidas, por ejemplo, por microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) en

una misma muestra; ya que el valor de  $R_H$  incluye la capa de iones que rodea y se mueve con las partículas en un medio acuoso.

Otro parámetro de gran relevancia es el potencial-Z, que hace referencia al potencial eléctrico de la doble capa de iones circundan la partícula y que se mueven con ella. El potencial-Z se mide a partir de la movilidad eléctrica de las partículas dentro de un campo eléctrico siguiendo un fundamento similar al de la DLS. El potencial-Z dicta la repulsión o atracción electrostática entre partículas (tendencia a mantenerse dispersas o a agregarse o flocular), de manera que valores alejados de 0 (negativos o positivos) indicarán una prevalencia de cargas comunes entre partículas que tenderán a repelerse y, por lo tanto, a mantenerse dispersas y estables. En términos generales, potenciales superiores/inferiores a  $\pm 30$  mV son indicativos de que la muestra no tenderá a agregarse [482]. El potencial-Z en conjunto con la tendencia de las nanopartículas a formar interacciones no covalentes, según su composición, determinarán significativamente la interacción de las mismas con el medio y con compuestos encapsulados [471, 483, 484]. En relación a esta última afirmación, la flexibilidad y la estructura geométrica también resultan parámetros clave en la biodistribución y transvase a través de barreras fisiológicas por parte del nanotransportador [485, 486].

Otro parámetro de gran importancia es la eficacia de encapsulación (EE) que un nanotransportador presenta para un compuesto específico. Esta se suele medir a partir de la fracción no encapsulada de un compuesto, comparada con la cantidad total empleada del mismo durante la preparación de las nanopartículas. Esta fracción se suele separar de la muestra mediante técnicas de diálisis, centrifugación o cromatografía para posteriormente ser cuantificadas mediante la técnica analítica que proceda. Para acabar, resulta trascendental considerar la estabilidad del nanotransportador en el organismo, así como el mecanismo y velocidad de liberación del principio activo encapsulado, de manera que se garantice en la medida de lo posible la accesibilidad del compuesto al nicho neoplásico [480, 483].

A continuación, se detallarán las principales estrategias dirigidas a la mejora y control de la biodistribución del fármaco hacia las células tumorales, resumidos en la **Figura 11**.



**Figura 11:** Esquema con las principales estrategias para la administración dirigida de agentes citotóxicos contra el tumor. A) Muestra las estrategias pasivas, centradas en el efecto EPR. B) Muestra la estrategia activa, que se basa en la funcionalización del nanotransportador con ligandos que interactuarán de manera más específica con las poblaciones celulares neoplásicas. **Fuente:** Modificación Kumari et al, 2015 [469]

### 3.2.1.1. Control pasivo de la biodistribución: Efecto EPR

Las estrategias encaminadas a dirigir de manera pasiva las nanopartículas conjugadas con los agentes citotóxicos a la región tumoral se basan en el aprovechamiento de las alteraciones estructurales asociadas al desarrollo neoplásico. En este contexto, el tamaño es uno de los parámetros con mayor influencia en el destino del nanotransportador dentro del organismo.

Por un lado, este factor influye de manera trascendental sobre el tiempo de vida media del nanomaterial tras su administración. Así, las partículas con diámetros hidrodinámicos inferiores a los 7 nm son rápidamente eliminados en la filtración renal [487]; las partículas superiores a los 50 nm pueden ser capturados por el hígado; y por último, las superiores a 100 nm son más fácilmente fagocitadas por el sistema fagocítico mononucleado [469, 479, 480].

Por otro lado, el tamaño del nanotransportador está estrechamente relacionado al llamado efecto de retención y permeabilidad mejorada (EPR, por sus siglas en inglés). Este efecto, descrito por primera vez en los años 80 [488], explica la tendencia que exhiben determinadas macromoléculas a acumularse en tejido tumoral. De esta manera, la alta actividad

angiogénica asociada al desarrollo neoplásico provoca que los vasos sanguíneos de nueva formación presenten, en la región tumoral, una arquitectura aberrante que favorece una mayor permeabilidad vascular [469, 489]. Estos vasos sanguíneos se caracterizan por presentar un lumen particularmente alargado y anchas fenestraciones que alcanzan un rango medio de tamaños entre 1-100 nm, aunque pueden llegar a los 4,7  $\mu\text{m}$  [490]; además, suelen carecer de pericitos, así como de la capa de músculo liso que conforma la pared vascular [491], y sus células endoteliales son comúnmente disfuncionales [492]. A causa de esto, macromoléculas de tamaños superiores a los 40kDa son capaces de extravasar la pared vascular y acumularse en el espacio intersticial de la región tumoral [469]. Otras características que favorecen este efecto se relacionan con el comportamiento disfuncional del drenaje linfático y el enlentecimiento del flujo sanguíneo característico de la región oncogénica [489, 493, 494].

El empleo de nanotransportadores que se ajusten a un rango de tamaños donde el efecto EPR favorezca la acumulación en la región neoplásica es la base de las mencionadas estrategias de biodistribución pasiva. Pese a que incluso nanopartículas superiores a los 400 nm son compatibles con el efecto EPR [495], el tamaño óptimo para la acumulación de los nanotransportadores ronda entre los 20 y los 200 nm [469]. Resulta importante considerar que el tamaño de la partícula suele influir significativamente sobre su EE, por lo que resulta importante alcanzar un compromiso entre la reducción del tamaño del nanotransportador y la pérdida de EE asociado al mismo [496]. Existen algunas limitaciones que pueden disminuir la acumulación derivada del efecto EPR, relacionadas con el aumento de la presión del fluido intersticial sobre el vaso sanguíneo producida por el ya mencionado drenaje linfático disfuncional y la presión ejercida por el crecimiento de la masa tumoral [469, 489]. Por otro lado, la densidad y composición de la matriz extracelular asociada al tumor juega un papel trascendental en la acumulación intersticial de los agentes citotóxicos, siendo especialmente desfavorables altas proporciones de colágeno en su composición [497].

Para acabar, aunque estrictamente no se trate de una estrategia de biodistribución pasiva propiamente dichas, resulta interesante mencionar la existencia de nanopartículas diseñadas para la liberación del compuesto en respuesta a un estímulo. En apartados posteriores se mostrarán ejemplos de este tipo de nanomateriales.



### 3.2.1.2. Control activo de la biodistribución: Funcionalización

Una de las principales ventajas del uso de nanotransportadores es que, en muchos casos, la modificación de la superficie de los nanomateriales es relativamente sencilla [475]; unir de manera covalente una gran variedad de elementos que pueden dar determinadas propiedades al nanotransportador. El control activo de la biodistribución parte de esta ventaja, basándose en los mecanismos de reconocimiento molecular específico entre un receptor celular y un ligando que se encuentra en la superficie del nanotransportador. De esta manera se produce una interacción dirigida entre el nanomaterial y aquellas células que expresen un marcador que, a modo de ejemplo, puede estar asociado a fenotipos oncológicos o a subpoblaciones tumorales como las CSCs. Con este fin se han empleado múltiples ligandos de superficie, entre los que se incluyen elementos de naturaleza proteica como anticuerpos; péptidos; vitaminas como es el caso del ácido fólico, ácidos nucleicos incluyendo aptámeros; y glicoproteínas como la transferrina [469, 495].

Como se ha mencionado, el control activo de la distribución del nanotransportador permite dirigir el tratamiento contra poblaciones neoplásicas específicas. Un claro ejemplo de lo mencionado es la terapia dirigida contra subpoblaciones CSCs mediante la interacción de CD44 con su ligando, el ácido hialurónico, o con anticuerpos específicos contra esta diana [483, 498]; aproximación que ha cosechado buenos resultados, a modo de ejemplo, en el diseño de nanotransportadores encapsulando doxorubicina [499], plaquitaxel [500] y curcumina [501]. Otro ejemplo interesante involucra el uso de aptámeros de CD133 para la administración dirigida de salinomycinina contra CSCs en osteosarcomas [502]. Resulta importante mencionar que la funcionalización no solo se emplea para conducir al nanotransportador. Considerando un ejemplo de uso ampliamente extendido, la funcionalización de las nanopartículas con poli(etilenglicol) (PEG) permite aumentar su tiempo de vida medio en el organismo dificultando la unión a opsoninas, lo cual retrasa su degradación por parte del sistema inmune [469]. Por otro lado, también resulta usual funcionalizar la membrana con elementos que interaccionen o sean sensibles a componentes de la matriz extracelular del tumor, de manera que se facilite su acceso y liberación de fármaco en la región tumoral, por ejemplo, por tras la liberación mediada por metaloproteasas [471]. Como muestra de estos casos, se han funcionalizado nanopartículas encapsulando docetaxel con ligandos de la integrina  $\beta 3$  para el tratamiento de tumores secundarios de hueso originados tras la evolución metastásica en cáncer de mama [503].

### 3.2.2. Tipos de nanotransportadores

La composición y naturaleza del nanotransportador tiene una importancia clave definiendo sus características fisicoquímicas, así como la manera en la que se producirá la conjugación y posterior liberación del compuesto activo. Existen multitud de nanomateriales empleados para la encapsulación de compuestos activos; clasificados en base a la naturaleza de sus componentes. En términos generales, los tipos de nanotransportadores orgánicos más estudiados son las nanopartículas (NPs) y las nanovesículas (NVs) [504].

En este apartado se revisarán las bases de algunos de los nanotransportadores de naturaleza orgánica más representativos con el fin de extender los conceptos de los nanotransportadores diseñados en los artículos del compendio 2 y 3.

#### 3.2.2.1. Nanovesículas

Las NVs son partículas coloidales compuestas por una o varias bicapas concéntricas formadas por lípidos y/o moléculas de naturaleza similar de manera que forman una membrana hidrófila que envuelve un núcleo acuoso interno. Esto provee al nanotransportador, normalmente, de una gran elasticidad y de la capacidad de encapsular tanto moléculas de naturaleza polar (en el núcleo acuoso), como apolar (embebidos en la membrana) [505, 506].

Los liposomas son el tipo de NVs históricamente más estudiados, estando compuestos esencialmente por fosfolípidos de membrana y, para aumentar su estabilidad, colesterol. Este último componente aportará una mayor rigidez a la membrana y tenderá a aumentar el tamaño de la nanopartícula, además de tener una influencia clave en la ratio de liberación del fármaco en el organismo [507]. A raíz del interés que suscitan, se han desarrollado múltiples tratamientos antitumorales basados en la encapsulación de agentes citotóxicos en liposomas [506]. Considerando algunos ejemplos con uso clínico establecido en el tratamiento de sarcomas, deben mencionarse Doxil® y Caelix®, complejos liposomales pegilados de unos 100 nm de diámetro que encapsulan doxorubicina, y que se han empleado para el tratamiento de sarcoma de Kaposi asociado a VIH; además de estar bajo estudio para el tratamiento de otros tipos de sarcoma [471, 508, 509]. Otros ejemplos son DaunoXone®, daunorubicina liposomal también empleado para tratar sarcoma de Kaposi [471, 510] y Mepact®, mifamurtida encapsulada para el tratamiento de osteosarcoma de alto grado [470, 511].

Pese a lo expuesto, el uso de liposomas presenta algunas desventajas relacionadas con su baja estabilidad y capacidad de retención de los compuestos encapsulados [505]. La adición de agentes surfactantes a la formulación provee a la vesícula de una mayor elasticidad y capacidad para deformarse sin perder la estructura, lo que se traduce en una mayor resistencia a la disrupción mecánica en el organismo y una capacidad de traspasar barreras biológicas incrementada; a costa de incrementar ligeramente la toxicidad asociada a los componentes de membrana (CMs) [505, 512]. De esta manera, se han diseñado sistemas vesiculares alternativos a los liposomas entre los que destacan los niosomas, que sustituyen la totalidad de los fosfolípidos por surfactantes no iónicos de cadena única; los etosomas, que introducen bajas concentraciones de etanol en la composición; o los transfersomas, una composición híbrida entre liposomas y niosomas [505]. Estas últimas nanovesículas son capaces de alcanzar un compromiso entre la gran flexibilidad de los niosomas y la biocompatibilidad de los liposomas, con la única desventaja de que resulta complejo alcanzar una formulación químicamente estable. Debido a su gran deformabilidad y resistencia, así como su alta capacidad de atravesar barreras biológicas; los transfersomas se han empleado esencialmente para la administración de fármacos por vía tópica [505, 512]. Sin embargo, dado que muchos sarcomas se sitúan en regiones de difícil acceso, el uso intravenoso de los transfersomas puede suponer una estrategia interesante que facilite el acceso del fármaco a la región neoplásica.

Adicionalmente a todo lo expuesto, resulta importante profundizar en los métodos de síntesis de NVs. La preparación de sistemas vesiculares aprovecha la tendencia a la agrupación espontánea en estructuras vesiculares que presentan fosfolípidos o moléculas anfifílicas de estructura similar al exponerse a un medio acuoso. En base a esto, se pueden considerar una gran variedad de métodos, los cuales tendrán una gran influencia en el tamaño y número de capas concéntricas que tendrá la vesícula al formarse [505]. En la **Tabla 4** se exponen los métodos más empleados para la generación de sistemas vesiculares.

Otro aspecto trascendental que debe tenerse en cuenta es la metodología de encapsulación del compuesto activo de interés. Dependiendo de su naturaleza hidrofílica o lipofílica, es posible llevar a cabo una encapsulación pasiva mediante la dilución del compuesto en la fase orgánica o en la fase acuosa previo a la formación del sistema vesicular. En contraste, existen técnicas de encapsulación activa centradas en la generación de un gradiente diferencial entre el interior y el exterior de la NV, de manera que se favorezca la difusión del compuesto hacia

el interior del nanotransportador. Las nuevas condiciones en el núcleo de la NV provocarán cambios conformacionales en el compuesto activo que favorecerán su retención dentro del nanovehículo [513]. Una vez se ha llevado a cabo la encapsulación, la fracción no encapsulada del compuesto se puede filtrar mediante ultra-centrifugación, cromatografía o diálisis.

**Tabla 4:** Métodos de preparación de NVs más representativos. Fuente: Recopilación [477, 505, 514-516]

Método	Descripción	Observaciones
<b>Hidratación de película fina</b>	Deshidratación de la fase orgánica con los CMs disueltos en un rotavapor. La película fina resultante se rehidrata en agitación con la fase acuosa.	Genera NVs unilamelares .
<b>Liofilización y rehidratación</b>	Dilución de los CMs y compuestos que favorezcan su solubilidad en una dilución compuesta por alcohol terbutílico y agua. La mezcla se liofilizará para su posterior rehidratación con un disolvente acuoso.	Gran variedad de estructuras y tamaños según la ratio lípido/ solubilizador.
<b>Inyección de fase orgánica</b>	Inyección a ritmo constante de la fase orgánica con los CMs disueltos sobre el disolvente acuoso calentado y en agitación. La fracción de la fase orgánica se elimina posteriormente en el rotavapor.	Variaciones de la técnica: adición gota a gota en lugar de la inyección.
<b>Evaporación en fase reversa</b>	Similar a la hidratación de película fina. La película deshidratada se purga con nitrógeno y se rehidrata en otro compuesto orgánico que se mezclará con la fase acuosa. La fracción orgánica se retira al rotavapor.	Genera vesículas muy grandes con una gran porción de la fase acuosa en el núcleo interno.
<b>Microfluídica</b>	Tanto la fase orgánica como la acuosa se mezclan tras ser conducidos por un sistema de capilares que acaban interconectándose en un microchip capilar de estructura definida.	La estructura del chip y los caudales de los capilares determinarán las características de las NVs.
<b>Métodos directos</b>	Tras la dispersión de los CMs directamente en la fase acuosa, se fuerza la formación de las estructuras vesiculares: ultrasonicación, agitación, extrusión en membrana porosa...	Gran variedad de estructuras según el método.

### 3.2.2.2. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (PNPs) engloban a aquellos nanomateriales conformados por la agrupación de una serie de polímeros de origen natural o sintético. Estas partículas se caracterizan por su alta biocompatibilidad así como por la inocuidad que presentan sus componentes al ser degradados en el organismo [517]. Además, la elaboración de estas nanoestructuras es sencilla y fácilmente escalable en términos de producción, existiendo además gran variedad de polímeros y estructuras disponibles a la hora de diseñar un nanotransportador adecuado para su uso en diferentes contextos y aplicaciones [484, 517].

A grandes rasgos, las PNPs se clasifican según su estructura interna, lo que determinará la manera en la que se organizarán los compuestos encapsulados. Así, las llamadas nanocápsulas presentan una estructura vesicular con un núcleo interno, hueco donde se localizarán los compuestos hidrófilos encapsulados (los hidrófobos en la membrana). Por otro lado, las nanoesferas conforman partículas sólidas a través de las cuales se encuentran embebidas las moléculas encapsuladas [484]. La estructura de las PNPs está determinada por el método de preparación llevado a cabo al generarlas. En la **Tabla 5** se reseñan aquellas de uso más extendido.

**Tabla 5:** Principales métodos de preparación de PNPs. Fuente: Recopilación [484, 517, 518]

Método	Características fase orgánica	Características fase acuosa	Procedimiento	Observaciones
<b>Evaporación del disolvente</b>	No miscible en agua Contiene: Polímeros + Compuesto activo	Contiene: Surfactante (estabilizador)	Emulsión entre disolventes orgánico y acuoso mediante ultrasonido u homogeneización de alta velocidad. Las partículas se forman al eliminar lentamente el disolvente orgánico.	Genera nanoesferas. Las PNPs se pueden ultracentrifugar para realizar lavados y liofilizar para su almacenamiento.
<b>Emulsificación</b>	Parcialmente miscible en agua Contiene: Polímeros + Compuesto activo	Contiene: Surfactante  Opcional: Agente desalante	Emulsión entre los disolventes orgánico y acuoso por agitación seguida de la saturación de la mezcla con agua, lo que inducirá la difusión de la fase orgánica y la generación de las PNPs	Genera nanoesferas o nanocápsulas si se añade aceite a la fracción orgánica. Inadecuado para encapsular compuestos hidrofílicos.
<b>Nano-precipitación</b>	Miscible en agua Contiene: Polímeros + Compuesto activo	Contiene: Surfactante	Adición lenta y constante de la de una de las fases sobre la otra en agitación, lo que provoca la precipitación de los polímeros.	Genera nanoesferas o nanocápsulas si se añade aceite a la fracción orgánica. Produce PNPs muy monodispersas.
<b>Polimerización en emulsión</b>	No	Contiene: Surfactante + agente iniciador + monómeros	Polimerización tras la interacción entre monómeros y un radical libre perteneciente a un agente iniciador. Este puede ser un monómero previamente activado.	Los monómeros iónicos o los iniciadores ionizables no necesitan surfactantes. Genera nanoesferas.

Además de su estructura, el tipo de polímero que compone las PNPs tendrá un impacto trascendental en sus características. Como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variedad de polímeros biodegradables e inoocuos con los que se pueden preparar PNPs con potencial para actuar como nanotransportadores de compuestos activos. Entre ellos, se

pueden distinguir los polímeros de origen natural como son el alginato de sodio, la gelatina, la albumina o el quitosano; o los polímeros de origen sintético como son las polilactidas (PLA), poliglicolidas, poliortoésteres, policaprolactonas, poli(lactida coglicólidos) (PLGA), polianhidridos, policianocrilatos, poli(ácido málico), poli(metil metacrilatos), poli(ácido metacrílico), ácidos poliacrílicos, polietilenglicol (PEG), poliacrilamida, poli(vinil alcohol) o la poli(N-vinil pirrolidona) [517]. A modo de ejemplo y con motivo de su interés en los artículos recogidos en este compendio, se destacarán los péptidos compuestos por PLGA y PLA.

El PLGA es el polímero de uso más extendido para aplicaciones biomédicas, estando aceptado por los principales organismos de validación farmacológica debido a que su hidrólisis genera productos altamente biodegradables como son el ácido glicólico y ácido láctico; que su vez se degradan en CO<sub>2</sub> y agua [518, 519]. Además, es posible modular la ratio de degradación de estas PNP en el organismo según el tamaño de las cadenas peptídicas empleadas, así como su hidrofobicidad variando la ratio de monómeros frente a los de ácido láctico (hidrófobo) o glicólico (hidrófilo) [519]. Pese a estas ventajas, resulta importante tener en cuenta que la naturaleza ácida de este polímero puede provocar modificaciones en los compuestos encapsulados, lo cual puede solucionarse mediante la adición de otros polímeros en la composición de la PNP [518]. Actualmente existen algunos tratamientos validados para uso clínico basados en la encapsulación de agentes antitumorales en PNP de PLGA como es Lupron Depot® (Abbvie Endocrine Inc.), acetato de leuprolida encapsulado empleado como terapia paliativa en cáncer de próstata avanzado [520]; o Trelstar (Allergan Sales Inc.). En relación al tratamiento de sarcomas, se llevado a cabo diversos estudios *in vitro* con resultados prometedores para el tratamiento con doxorrubicina encapsulada en partículas de PLGA para sarcoma de Kaposi [521] y sarcomas uterinos [522]; y en modelos de sarcomas murinos con doxorrubicina y cis-platino encapsulado [523, 524].

Por otro lado, los polímeros de PLA se conforman de monómeros de ácido láctico, de manera que presentan un fuerte carácter hidrófobo y generan cadenas peptídicas con gran resistencia mecánica [525]. Como en el caso anterior, el producto de su degradación, el ácido láctico, es inócua y biodegradable en el organismo por lo que este compuesto ha sido aceptado por los principales mecanismos de regulación farmacológica [526]. Mencionando algunos ejemplos de su potencial como nanotransportador en el tratamiento del cáncer, la encapsulación de daunorrubicina y ácido glicirrítico en PNP de PLA para el tratamiento

combinado de leucemia ha dado buenos resultados en modelos preclínicos [527]. Otros ejemplos incluyen el tratamiento de cáncer de ovario, también en modelos preclínicos, con doxorubicina encapsulada, logrando revertir la resistencia y mejorando la acumulación del tratamiento en la región neoplásica [528]. Con respecto a la terapia de sarcomas, se ha estudiado el efecto de la doxorubicina encapsulada en partículas de PLA para el tratamiento *in vitro* de osteosarcomas, encontrándose efectos similares al tratamiento con el fármaco libre [529].

### **3.2.2.3. Hidrogeles**

Pese a representar a un grupo de nanotransportadores de uso menos extendido que los mencionados anteriormente, las características de los hidrogeles (HGs) los sitúa como nanomateriales con un gran potencial para la distribución de fármacos antitumorales en el organismo, entre otras aplicaciones de interés biomédico. Los HGs se componen de redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos interconectados que mantienen absorbido un medio de naturaleza acuosa [530].

Los polímeros que conforman estas redes son biodegradables, siendo común emplear quitosano, ácido hialurónico, alginato, diferentes poliésteres o polifosfacenos [531]. El proceso de gelificación químico o físico suele conllevar la adición de los polímeros en una disolución acuosa con unas condiciones específicas, como un pH o una temperatura concreta, que estarán determinadas por el polímero y el tipo de HG que se va a preparar; y la mezcla de los mismo, por ejemplo, mediante ultrasonidos [531, 532]. Estas redes pueden abarcar un gran abanico de tamaños, aunque este apartado se centrará en los llamados nanogeles, cuyas redes se componen por fibras inferiores a los 200 nm.

Los HGs presentan una alta biocompatibilidad y una toxicidad sistémica inapreciables, a la vez que son capaces encapsular grandes cantidades de compuestos de diferente naturaleza dada su arquitectura altamente porosa [530]. Más allá de estas características, los HGs tienen una serie de ventajas con respecto a otros nanotransportadores de uso más estandarizado, como son una alta capacidad de bioadhesión, el poder deformarse de manera reversible y una alta hidrofilia, lo que les permite atravesar con mayor facilidad ciertas barreras fisiológicas y tener tiempo de vida en el torrente sanguíneo superior [531, 533]. Adicionalmente, el diseño de HGs presenta múltiples opciones que permiten inducir de manera programada la liberación del compuesto encapsulado ante estímulos concretos.

Dichos estímulos provocan variaciones entre las interacciones moleculares existentes entre los péptidos que componen el HG, lo que conduce a un aumento de su volumen o a su disociación favoreciendo la salida del compuesto [531, 533, 534].

Clasificando los tipos de hidrogeles según el tipo de estímulo que inducirá la liberación del compuesto encapsulado, cabe destacar los HGs sensibles a temperaturas superiores a un determinado valor crítico [535]. Se han puesto a prueba múltiples HGs termosensibles para el tratamiento del cáncer con resultados prometedores, incluyendo el tratamiento de osteosarcomas con doxorubicina y un shRNA para el silenciamiento de PKL1 encapsulados en modelos preclínicos [536] o el tratamiento con paclitaxel encapsulado para el tratamiento de cáncer de mama [537]. Otro tipo de nanotransportadores comúnmente empleados son los sensibles a pH, los cuales presentan un gran interés para el tratamiento dirigido del cáncer debido a la acidificación característica del microambiente tumoral [538]. Mencionado algunos ejemplos, se han obtenido resultados significativos en el tratamiento de modelos preclínicos con doxorubicina encapsulada en el cáncer de hígado [539] y mama [540]. También resulta interesante destacar los HGs fotosensibles, los cuales se han estudiado, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer de mama con cisplatino [541]. Además de los mencionados, se han diseñado HGs sensibles a ultrasonidos, a campos magnéticos o incluso a reacciones RedOx. Por otro lado, resulta importante tener en cuenta la posibilidad de generar HGs sensibles a varios estímulos [531].

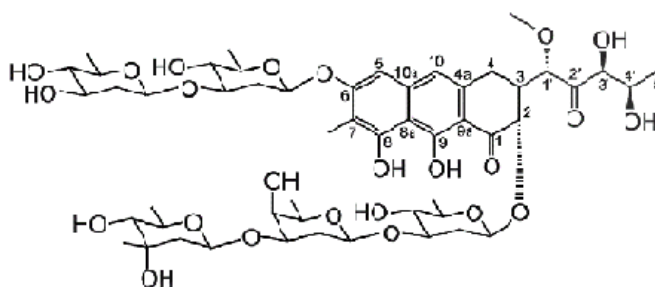
Para acabar, resulta interesante mencionar algún uso alternativo de los HGs para el tratamiento del cáncer. Así, se han obtenido buenos resultados para el tratamiento de sarcomas de tejido blando en modelos murinos a los que se ha inyectado hidrogel con capacidad de activar doxorubicina inactiva (mediante la adición a nivel molecular de un grupo *trans*-ciclooctano) en la región neoplásica [542]. De esta manera, la posterior exposición a doxorubicina inactiva provoca su acumulación en la región tumoral debido a la interacción con el HG, lo cual provocará, a su vez, la activación del tratamiento en una región exclusiva [542].

### **3.3. Mitramicina y mitrálogos**

La mitramicina (MTM) o plicamicina, es un antibiótico de origen natural producido por varias cepas del género *Streptomyces* perteneciente a la familia de los ácidos aureólicos y, dentro de esta clasificación, al grupo de los policétidos aromáticos [543]. Los miembros de



esta familia de antibióticos contra bacterias Gram positivas, muchos de los cuales presentan actividad antineoplásica, se caracterizan por contener un sistema tricíclico con anillos aromáticos unidos a una cadena alifática dihidroxi-metoxi-oxopentilo; estructura que les da un característico color amarillo y fluorescencia [544]. Esta estructura se puede apreciar en la **Figura 12**, donde se muestra una molécula de MTM.



**Figura 12:** Estructura molecular de la MTM. Fuente: Modificación Kormanec et al, 2020 [544]

El principal mecanismo de acción de la MTM conlleva la unión en regiones del ADN ricas en GC, inhibiendo la unión de factores de transcripción a esas regiones y, por consiguiente, la síntesis del RNA transcrito para los genes afectados [544]. Resulta interesante mencionar el papel que juegan los cationes bivalentes como el magnesio en la interacción de la MTM, siendo claves para la interacción de la MTM con el ADN, así como para la capacidad que esta presenta para formar dímeros estables entre moléculas similares [545].

Volviendo al mecanismo de acción de la MTM, se ha determinado que la inhibición de la transcripción mediada por SP1 resulta la principal vía de acción antineoplásica de este compuesto [546]. De esta manera, la disrupción de la transcripción regulada por SP1 afecta a la expresión de dianas clave para el desarrollo y mantenimiento neoplásico como cMYC, XIAP, VEGF o KLF5 [544, 547].

Durante los años 70, el gran potencial antineoplásico de la MTM llevó a su aprobación para uso clínico en el tratamiento de diversos tumores incluyendo carcinoma testicular o varias histologías de leucemia [544]. Sin embargo, el tratamiento de la MTM conlleva una alta toxicidad sistémica para el paciente, incluyendo daños a nivel hepático, vascular, renal, gastrointestinal y en la médula ósea [548, 549]. Por este motivo su uso quedó relegado hasta los años recientes, cuando el desarrollo de nuevas pautas de tratamiento, la caracterización de nuevas dianas oncológicas y el diseño de compuestos derivados de la MTM con un potencial terapéutico mejorado, ha vuelto a poner el foco en este antibiótico.

Mencionando algunos ejemplos de su potencial antitumoral, se ha reportado que la MTM muestra una gran actividad contra cáncer colorrectal, siendo además capaz de afectar a las subpoblaciones CSCs del mismo [550]. Se ha encontrado un efecto similar en modelos preclínicos con tumores de mama avanzados [551] en los que, además, se ha visto que presenta un efecto sinérgico al combinarse con doxorubicina [552]. Otros tumores en los que la MTM ha demostrado tener un efecto antitumoral significativo mediante la inhibición de SP1 incluyen en cáncer de próstata [553], en carcinoma pancreático donde la MTM se encapsuló en PNP de mPEG-PLGA [554]; en glioblastomas donde logro disminuir la expresión de marcadores CSCs como SOX2 [555]; o en cáncer de ovarios, promoviendo la expresión del microRNA oncosupresor miRNA-335 [556].

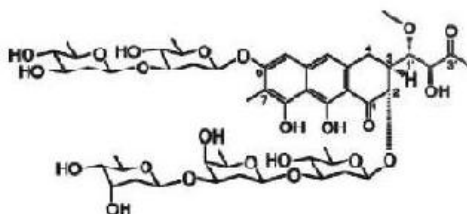
Con respecto al tratamiento de sarcomas, se ha demostrado que la MTM resulta muy efectiva para el tratamiento de sarcoma de Ewing, donde es capaz de suprimir la expresión de EWS-FLI1 [557]. Sin embargo, la investigación en este caso cesó en fase clínica II debido a la alta hepatotoxicidad del tratamiento [557]. En relación a este último ejemplo, se ha reportado que el cotratamiento con MTM e inhibidores de CDK9 puede reducir significativamente la toxicidad sistémica del primero [558] y, además, el tratamiento con MTM incrementa la sensibilidad del tejido neoplásico a la radioterapia [559]; abriendo la puerta a aplicaciones clínicas futuras asociadas a menor toxicidad sistémica.

Resulta interesante mencionar que actualmente se están llevando a cabo estudios en fase clínica I/II para la inhibición de subpoblaciones CSCs mediante el tratamiento con MTM en pacientes con neoplasias torácicas primarias o con carcinas, sarcomas o neoplasias germinales con metástasis pleuropulmonares (NTC02859415).

### **3.3.1. Análogos de la mitramicina: El E-8042**

Como se ha mencionado en el apartado anterior, pese al gran potencial de la MTM como agente antitumoral, su ventana terapéutica está limitada debido a su alta toxicidad sistémica. Por este motivo, se han desarrollado numerosas moléculas análogas a la MTM (mitrálogos) generadas a través de la modificación mediante ingeniería genética de su ruta de biosíntesis original. De esta manera se han obtenido varios mitrálogos con un potencial antineoplásico similar contra diferentes tumores y con una menor toxicidad sistémica asociada al tratamiento que la MTM, como es el caso del 3D-demicarosil-3D- $\beta$ -D-digitoxosil-mitramicina-SK (DIG-MTM-SK), o EC-8042 [544, 560].

El mitrólogo EC-8042 fue generado mediante biosíntesis combinatoria en dos cepas modificadas de *Streptomyces argillaceus* en la que se combinaron las rutas de biosíntesis de la MTM y de la tetracenomicina C [561]. La estructura resultante de dicha modificación se puede apreciar en la **Figura 13**, donde se muestra la estructura molecular del EC-8042.



**Figura 13:** Estructura molecular del EC-8042. Fuente: Modificación Kormanec et al, 2020 [544]

Diversos estudios han evidenciado el enorme potencial del EC-8042 como agente antineoplásico. Para empezar, se ha demostrado que el EC-8042 sigue un mecanismo de acción similar al de la MTM en cáncer de ovario, mostrando además una mayor capacidad inhibitoria que esta [560]. De manera similar, se ha reportado que este compuesto es capaz de inhibir EWS-FLI1 en modelos preclínicos de sarcoma de Ewing mostrando un efecto antitumoral similar a la MTM, pero con una toxicidad sistémica considerablemente más baja [562]. Reforzando esta idea, se ha encontrado que el EC-8042 presenta una mayor capacidad inhibitoria de varias dianas reguladas por SP1 que la MTM en ensayos *in vitro* con líneas de cáncer de ovario, de mama, carcinoma de páncreas y cáncer colorrectal [563]. Por otro lado, también se ha demostrado un gran potencial antitumoral en modelos preclínicos de melanoma [564] y cáncer de mama de alto grado donde, además, mostró un comportamiento sinérgico en tratamientos combinatorios con fármacos comúnmente empleados para el tratamiento de estas neoplasias [565].

Entre las principales características del EC-8042, cabe destacar su alta efectividad contra subpoblaciones CSCs. En relación a esto, se ha evidenciado su capacidad para acabar con estas células en modelos preclínicos de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, donde mostró, además, un efecto antitumoral complementario en combinación con dasatinib [566]. De igual manera, se ha reportado una alta capacidad del EC-8042 para afectar a las subpoblaciones CSCs en modelos murinos de cáncer de próstata [567], y en cáncer de ovario donde el tratamiento con el mitrólogo en modelos animales logró sensibilizar con una

toxicidad reducida líneas resistentes al tratamiento con cisplatino [568]. Para acabar, cabe destacar que el EC 8042 ha mostrado una alta capacidad para eliminar las subpoblaciones CSCs en modelos preclínicos de liposarcomas mixoides, sarcomas pleomórficos no diferenciados y líneas primarias de condrosarcomas derivadas de pacientes donde, además, se reportó que el mitralgo no es sustrato de las bombas ABC, asociadas a la resistencia de células neoplásicas al tratamiento [42, 569].

#### **4. Hipótesis y objetivos**

Resulta común que los sarcomas presenten un desarrollo agresivo unido a una alta capacidad metastásica y a la adquisición de resistencia contra los tratamientos anti-tumorales. El pronóstico en estos casos es generalmente muy desfavorable, y apenas han aparecido potenciales terapias alternativas que puedan mejorar esta situación en las últimas décadas. Por este motivo, el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de sarcomas resulta crucial.

Debido a la complejidad de la señalización pro-tumoral, a la emergencia de subpoblaciones de CSCs dentro de los tumores y a la aparición de mecanismos de resistencia, en este trabajo se plantea la posibilidad de que el uso de compuestos con capacidad para reprimir la activación de múltiples rutas pro-tumorales de forma simultánea pueda ser la base de estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de los sarcomas. Teniendo en cuenta este planteamiento general, formulamos las siguientes hipótesis específicas:

**Hipótesis 1:** Se ha descrito que varios compuestos de la familia de los indolocarbazoles son capaces de inhibir múltiples dianas asociadas a la actividad quinasa vinculadas al desarrollo neoplásico. Entre estos inhibidores, el EC-70124 ha demostrado un alto potencial antineoplásico contra diversos tumores, característica que podría extenderse a los sarcomas.

**Hipótesis 2:** Diversos estudios han evidenciado que la encapsulación de agentes citotóxicos en nanotransportadores permite la mejora de sus parámetros de biodistribución en el organismo. Esta estrategia, permitiría mejorar la ventana terapéutica de compuestos con un alto potencial antineoplásico pero que presentan efectos secundarios graves para el paciente. Este puede ser el caso de la MTM, un compuesto que ha demostrado una potente acción antitumoral mediada por su capacidad para inhibir la actividad trans-activadora de múltiples factores de transcripción.

**Hipótesis 3:** El análogo de la mitramicina EC-8042, un compuesto que ha demostrado una actividad anti-tumoral similar a la MTM pero con una toxicidad sistémica mucho menor, ha demostrado un alto potencial para eliminar las subpoblaciones de CSCs en diversas neoplasias. Considerando que la presencia de estas células en osteosarcomas es recurrente, se plantea estudiar si el compuesto mantiene la actividad contra CSCs en estos tumores y caracterizar su mecanismo de acción.

Considerando las hipótesis expuestas, se plantean los siguientes objetivos generales:

**Objetivo 1:** Estudiar el potencial antitumoral del inhibidor multiquinasa de la familia de los indocarbazoles EC-70124 para el tratamiento de sarcomas.

**Objetivo 2:** Encapsular el agente antineoplásico MTM en nanotransportadores como forma de mejorar su ventana terapéutica en el tratamiento de sarcomas.

**Objetivo 3:** Caracterizar la actividad anti-tumoral y anti-CSC del análogo de la MTM EC-8042 en osteosarcomas y analizar los mecanismos moleculares involucrados.

## **CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## Material y métodos

Todos los protocolos experimentales realizados en este trabajo se han llevado a cabo de acuerdo a las directrices institucionales dictadas por los comités de revisión científica y han sido aprobados por el Comité Institucional de Ética del Principado de Asturias (ref.255/19).

### 1. Diseño y preparación del tratamiento

#### 1.1. Agentes citotóxicos

En esta sección se detallará todo lo relacionado con los inhibidores usados en cada artículo, los cuales aparecen listados en la **Tabla 6**.

**Figura 6:** Inhibidores usados en los trabajos comprendidos en el compendio

Compuesto	Principal mecanismo de acción	Origen
<b>Doxorrubicina</b>	Inhibidor de ADN topoisomerasa II.	Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EEUU).
<b>Mitramicina</b>	Inhibición de la transcripción, especialmente la mediada por SP1.	EntreChem SL (Asturias, España).
<b>EC-8042</b>	Inhibición de la transcripción, especialmente la mediada por SP1.	EntreChem SL.
<b>EC-70124</b>	Inhibidor multiquinasa. Inhibidor de ADN topoisomerasa I.	EntreChem SL.
<b>Midostaurina</b>	Inhibidor multiquinasa.	Biomar Microbial Technologies ( León, España).
<b>Torin 2</b>	Inhibidor de mTOR.	Selleckchem (Houston, Texas, EEUU).
<b>Sorafenib</b>	Inhibidor multiquinasa.	Selleckchem.
<b>Pazopanib</b>	Inhibidor multiquinasa.	Selleckchem.
<b>Imatinib</b>	Inhibidor multiquinasa, especialmente RTKs.	Selleckchem.
<b>BYL-719</b>	Inhibidor de PI3K $\alpha$ .	Selleckchem.
<b>BP-1-102</b>	Inhibidor de STAT3.	Selleckchem.
<b>Ruxolitinib</b>	Inhibidor de JAK1/2.	Selleckchem.
<b>Valspodar</b>	Inhibidor ABCB1.	Selleckchem.
<b>Ko143</b>	Inhibidor ABCG2.	Selleckchem.

Para la realización de los tratamientos *in vitro*, los diferentes compuestos, inicialmente liofilizados, fueron rehidratados en DMSO estéril (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) a una concentración de stock de 10 mM y se almacenaron a -20°C



o a -80°C según el caso. En estos casos se prepararon las diluciones finales en medio de cultivo justo antes de la realización de los diferentes ensayos.

Con respecto a los tratamientos *in vivo*, los compuestos fueron rehidratados en fresco con suero fisiológico estéril (NaCl al 0,9%) (B. Braun, Melsungen, Alemania) a las concentraciones requeridas según el experimento; y posteriormente administrados por vía intravenosa.

## **1.2. Ingeniería de nanomateriales**

En este apartado se detallarán las diferentes metodologías llevadas a cabo para preparar los nanotransportadores con MTM encapsulada descritos en los **Artículos 2 y 3** de este compendio, así como para la caracterización de cada uno de ellos.

### **1.2.1. Preparación de nanovesículas**

#### **1.2.1.1. Vesículas liposomales unilamelares pequeñas**

Los liposomas fueron generados mediante el método de evaporación en fase reversa. En un inicio, 20 mg de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (Sigma Aldrich) y 70  $\mu$ L de Miglyol-812 (Fagron Iberica, Barcelona, España), ambos lípidos que conformaran la membrana liposomal, fueron diluidos en 250  $\mu$ l de etanol absoluto (grado HPLC, Sigma Aldrich). Por otro lado, se añadieron a esta mezcla 4,75 mL de acetona en la que se disolvieron 3 mg de MTM, formando la fase orgánica. Esta fue entonces añadida gota a gota sobre una solución acuosa con el surfactante Pluronic F-127 a una concentración de 1 mg/mL, sometida a fuerte agitación. Tras la completa inyección de la fase orgánica, la mezcla se dejó homogeneizando durante 10 minutos en agitación. A continuación, la fase orgánica fue lentamente evaporada a 40°C en condiciones de baja presión durante 20 minutos. La MTM no encapsulada y el exceso de surfactante fueron eliminados mediante diálisis en agua miliQ durante 1 h a 25°C usando un casete de diálisis con un umbral de paso de 3500 kDa.

#### **1.2.1.2. Transfersomas**

Para obtener nanovesículas que encajasen dentro de unas características adecuadas para el ensayo biológico (un rango de tamaños alrededor de los 100 nm, baja disparidad de tamaños y una alta EE) se testaron diferentes formulaciones de componentes de membrana incluyendo los surfactantes monostearato de sorbitan (S60, Span 60; Sigma Aldrich) y polisorbato 20 (T20, Tween<sup>®</sup> 20; Sigma Aldrich); fosfatidilcolina de soja (PC, Phospholipon

90; Lipoid, Ludwigshafen, Alemania); y colesterol (Cho, Sigma Aldrich). Además, se probaron dos métodos de preparación diferentes.

Por un lado, se prepararon vesículas por el método de hidratación en película fina. Las diferentes formulaciones de componentes de membrana se diluyeron en 100 µl de etanol absoluto a una concentración de 40 mg/mL. Esta mezcla fue evaporada con un flujo de N<sub>2</sub> quedando una película lipídica en el fondo del recipiente que fue posteriormente rehidratada con 2 mL de PBS estéril (Corning, Nueva York, EEUU). A continuación, la muestra fue expuesta a sonicación durante 2 minutos a una amplitud del 55%.

El otro método puesto a prueba fue la inyección en etanol. Las formulaciones se disolvieron en 5 mL de etanol absoluto obteniéndose una concentración final de 20 mg/mL. La fase orgánica se inyectó con una jeringa impulsada a una velocidad constante de 120 ml/h por una bomba de jeringa sobre 50 mL de agua miliQ a 60°C y sometida a fuerte agitación. El etanol fue eliminado de la mezcla haciendo uso de un rotavapor a 40°C y 65 mbar y, posteriormente, las muestras fueron sonicadas durante 2 minutos a una amplitud del 55%.

La encapsulación la MTM se llevó a cabo añadiendo a la fase orgánica MTM a 1 mg/mL previo a la formación de las NVs. La MTM no encapsulada fue filtrada con unidades de filtrado por centrifugación “Amicon<sup>TM</sup> Ultra-0.5 centrifugal filter units” (EMD Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU) tras centrifugar 20 minutos a, aproximadamente, 14500 g. Los nanocoloides retenidos en el filtro fueron resuspendidos en 500 µl de una solución estéril de PBS. A raíz de los resultados obtenidos, el método de TFH se postuló como la técnica principal para la encapsulación de MTM para reducir el gasto del compuesto al trabajar con volúmenes inferiores.

## **1.2.2. Síntesis de nanopartículas poliméricas**

### **1.2.2.1. Nanopartículas de Poli(rac-lactida)**

En el caso de las PNPs de PLA, fue necesario preparar las unidades poliméricas a partir de monómeros de lactida.

**Polimerización:** Los polímeros que componen estas partículas se generaron a partir de una mezcla racémica de monómeros de L y R-lactida (rac-lactida; Sigma-Aldrich). Para ello se siguió el método de polimerización por apertura de anillo de los monómeros, que previamente fueron sublimados hasta tres veces y almacenados bajo una atmósfera inerte en

una caja de guantes. La catálisis se llevó a cabo en una atmósfera inerte con N<sub>2</sub> generada en una rampa de vacío (o línea de Schlenk) empleando como agente iniciador de la polimerización el complejo (ZnEt[κ<sup>3</sup>-bpzte]) [570]. Así, se añadieron 90 μmoles del agente iniciador sobre 20 mL de tolueno (Sigma Aldrich) desecado con sodio metálico, y en el que previamente se habían disuelto diferentes concentraciones de monómeros (con el fin de generar péptidos de diferente peso molecular) después de ser purificados mediante destilación con sodio. La reacción de polimerización se efectúa durante 4h a 90°C y, una vez finalizada, los polímeros fueron precipitados con metanol, filtrados, rehidratados en tetrahidrofurano (libre de inhibidores, grado HPLC, >99,9%; Sigma Aldrich) para posteriormente volver a ser precipitados con metanol; y secados con vacío.

**Formulación de PNPs:** Las PNPs de PLA con MTM encapsulada se generaron mediante el método de desplazamiento del disolvente. De esta manera, 80 mg de los polímeros de PLA y 10 mg de MTM se disolvieron en 6 mL de acetona (Sigma Aldrich) formando la fase orgánica. Esta fue añadida gota a gota en una ratio de 2 ml/min, sobre 10 mL de una solución acuosa al 1% de poli(vinil alcohol) (PVA, 98-99% hidrolizado; Sigma Aldrich) en agitación continua. La acetona fue evaporada lentamente en condiciones de baja presión dando como resultado una suspensión con las PNPs de PLA. A continuación, la muestra fue centrifugada durante 20 minutos a, aproximadamente, 15000 g a fin de retirar el sobrenadante con la fracción de MTM no encapsulada y el exceso de surfactante. Este proceso de lavado se realizó, al menos, 3 veces. Finalmente, las PNPs con MTM fueron resuspendidas en agua miliQ para su posterior liofilización y almacenamiento a -20°C.

#### **1.2.2.2. Micelas de Poli(lactida-co-ácido glicólico)**

En el caso de las PNPs de PLGA, se partió de cadenas peptídicas ya formadas adquiridas comercialmente (Sigma Aldrich). Como en el caso de los transfersomas, se llevó a cabo una primera etapa de optimización en la que se prepararon varias formulaciones de PLGA con la intención generar vesículas con una relación de tamaño y polidispersidad adecuadas para los ensayos biológicos y a la vez que mostraran una alta EE.

Las PNPs fueron generadas por el método de evaporación del disolvente. De esta manera, se prepararon 2 mL de cloroformo (grado HPLC; Sigma Aldrich) con un 12,5 % de metanol (grado HPLC; Sigma Aldrich) en la que se disolvieron los polímeros de PLGA en una concentración de 10 mg/mL. Por otro lado, se prepararon 25 mL de fase acuosa con PVA al

1% y los diferentes componentes que formarán parte de la membrana micelar de la PNP, en este caso S60; PC y Cho, en diferentes ratios molares (según la formulación) hasta alcanzar una masa final de 8,7 mg. Partiendo de las condiciones expuestas, se realizó una mezcla con las fases orgánica y acuosa y se generó una emulsión mediante ultrasonificación durante 2 minutos con una amplitud del 50%. Para acabar, la fase orgánica fue lentamente evaporada durante toda una noche con agitación en condiciones ambientales.

En lo que respecta a la encapsulación de la MTM, se trabajaron con volúmenes inferiores de cara reducir el gasto de compuesto. En cada caso, se mezclaron 2 mL de fase orgánica en la que se disolvió 1 mg/mL de MTM con 6mL de fase acuosa. El filtrado de la MTM no encapsulada se llevó a cabo de manera similar a el caso de los transfersomas.

### **1.2.3. Gelificación: Preparación de hidrogeles**

Los hidrogeles empleados en este trabajo están compuestos por ácido 5-(3-(4-nitrofenil)ureido)isoftálico generados a partir de pequeños cambios de pH provocados por la hidrólisis controlada de glucono- $\delta$ -lactona [532]. La encapsulación de la MTM se llevó a cabo de manera pasiva añadiendo una concentración de 3 mg/mL en la mezcla previo a la gelificación. De esta manera, 10 mg del componente del HG se disolvió en 1 mL de una solución acuosa con NaOH 0,1 M, junto a 2,5 mg de la glucono- $\delta$ -lactona. La mezcla fue incubada en condiciones ambientales durante 24 h, produciéndose la gelificación.

### **1.2.4. Caracterización de nanotransportadores**

#### **1.2.4.1. Morfología**

La distribución de tamaños y morfología de las nanopartículas empleadas en el **Artículo 3** (liposomas, PNPs de PLGA e HG) fue observada mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) de presión variable “Jeol 6490LV” (Jeol Ltd., Tokio, Japón), equipado con electrones secundarios, retrodispersados y detectores de dispersión de energía por rayos X. Para ello, fue necesario recubrir las nanoestructuras con oro-platino empleando un pulverizador catódico “SC7620-Quorum Technologies” para evitar interacciones asociadas a cargas eléctricas y mejorar la resolución de la imagen. Por otro lado, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de alta resolución haciendo uso de TEM “Jeol JEM 2100” (Jeol Ltd.) operando a 200 kV y equipado con un detector “Oxford Link EDS”. Para no ocasionar daño a las muestras, la observación de las mismas se realizó con una baja

exposición. Las imágenes obtenidas fueron analizadas empleando el software “Digital Micrograph™” (Gatan, Pleasanton, California EEUU)

En el caso de los nanotransportadores estudiados en el **Artículo 2** (transfersomas y PNP de PLGA), también se realizó un estudio mediante TEM, en este caso con tinción negativa depositando una gota de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de carbón sobre la que se adicionó una gota de una solución al 2% de ácido fosfotúngstico. Tras un minuto de incubación, se eliminó el ácido con un papel de filtro y se dejó secar la muestra al aire. Finalmente se realizó el análisis en un microscopio JEOL-2000 Ex II TEM (Jeol Ltd.).

#### **1.2.4.2. Estructura**

En todos los nanovehículos diseñados, el radio hidrodinámico medio, el PDI y el potencial Z fue estudiado mediante DLS empleando el “Zetasizer Nano ZS” (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). Para la medida, se establecieron como parámetros base 5 medidas por muestra, una viscosidad media de 1054 cP, un índice de refracción de 1,33, ángulo de dispersión de 173°,  $\lambda = 633\text{nm}$  y 25°C de temperatura. Por otro lado, los datos fueron analizados empleando el software base asociado al equipo.

Con el fin de testar la estabilidad estructural de las nanopartículas, varias muestras de liposomas previamente diluidos 1/10 en PBS y de PNP de PLA a una concentración de 1 mg/mL se dejaron en incubación a 37°C para su posterior análisis en el DLS a varios intervalos de tiempo.

#### **1.2.4.3. Eficacia de encapsulación y carga**

La EE y la eficiencia de carga (LE) de la MTM fue calculada según las ecuaciones:

$$EQ1: LE\% = \frac{\text{masa de MTM encapsulada (mg)}}{\text{masa de MTM total (libre y encapsulada)(mg)}} \times 100$$

$$EQ2: EE\% = \frac{\text{masa de MTM encapsulada (mg)}}{\text{masa total de MTM añadida en un inicio (mg)}} \times 100$$

La cuantificación de los parámetros requeridos en estas ecuaciones varió según el nanotransportador estudiado.

**PNPs de PLGA y liposomas:** 10 mg de las nanopartículas liofilizadas en el caso de las PNP y 1 mL de suspensión en el caso de las NVs; se colocaron en una membrana de diálisis con

un umbral de paso de 3500 kDa y se incubaron en 10 ml de PBS a 37°C con una leve agitación constante. A diferentes intervalos, se fueron retirando 3 mL del medio en los que se cuantificó la cantidad de MTM liberada mediante la medida de fluorescencia emitida a 570 nm de longitud de onda.

**HG:** En estas muestras, se depositaron 0,25 mL de HG y 2,75 mL de PBS en una cubeta de espectrofotometría y se fue midiendo la cantidad de MTM liberada a diferentes intervalos en las mismas condiciones que el caso anterior.

**Transfersomas y PNP de PLGA:** Como se explicó anteriormente, la MTM libre y las diferentes nanopartículas fueron separadas a través de los filtros “Amicon™ Ultra-0.5 centrifugal filter units”. La cantidad de MTM libre en el medio filtrado y en la suspensión de nanopartículas previamente lisadas con metanol se analizó por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) equipado con un detector UV/VIS “HP G1315A” y un detector de fluorescencia “1260 Infinity A” (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). La columna cromatográfica de fase reversa fue una “Zorbax Eclipse Plus C18” con partículas de 5 µm de tamaño, 4,6 mm x 150 mm (Agilent Technologies). La fase móvil consistió en un gradiente variable de agua miliQ y metanol con un caudal de 0,8 mL/min y una temperatura de 30°C. En un inicio, la fase móvil estaba compuesta por un 80% de agua miliQ frente a un 20% de metanol, proporción que fue variando durante los primeros 5 minutos de elución llegando al 100% de metanol. Tras esto se eluyeron las muestras con metanol al 100% durante 5 minutos más. Además, la columna fue lavada y equilibrada con metanol al 100% antes de cada inyección de muestra. La cantidad de MTM fue calculada midiendo la absorbancia en el detector UV/VIS a 280 nm.

## **2. Ensayos de biología celular *in vitro***

### **2.1. Bases del cultivo celular**

En este apartado se establecerán las materias y condiciones esenciales sobre las que se desarrollaron los procedimientos relacionados con cultivos celulares. Todos los ensayos se llevaron a cabo en esterilidad trabajando en cabinas de seguridad biológica clase I o II.

#### **2.1.1. Líneas celulares**

En la **Tabla 7** se muestra la relación de líneas celulares con las que se ha trabajado en los diferentes estudios incluidos en este trabajo.

**Líneas comerciales:** Una fracción importante de las células corresponde a líneas comerciales inmortalizadas originadas a partir de diferentes histologías de sarcomas u otros tumores.

**Líneas tumorales derivadas de hMSC:** Otra parte corresponde a modelos de célula de origen que se han generado a partir de la transformación secuencial de hMSC derivadas de médula ósea (BM-MSC) con una serie de eventos oncogénicos especialmente relevantes en el desarrollo de sarcomas. Estos eventos incluyen la sobreexpresión de TERT, la inhibición de p53 y Rb mediante la expresión de los antígenos E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV-16), la inactivación de la actividad fosfatasa PPA2 mediante la expresión del pequeño antígeno T del virus SV40 (SV40-ST), la sobreexpresión del oncogén H-RASv12, y la expresión de la proteína de fusión FUS-CHOP (FC). Según los eventos oncológicos acumulados en las diferentes construcciones celulares, el fenotipo tumoral desarrollado tras su inyección en modelos murinos inmunodeprimidos es variable (en cada caso se detalla en la **Tabla 7**). Por otro lado, se derivaron líneas celulares con un perfil neoplásico más agresivo a partir de tumores generados con los diferentes modelos celulares en los mencionados modelos animales. Estas líneas se nombran con el prefijo “T”.

**Líneas primarias:** Las líneas primarias empleadas en este trabajo se establecieron a partir de muestras de tejido neoplásico de pacientes adquiridas a través de la colaboración con el Banco de Tumores del Hospital Universitario Central de Asturias (PT17/0015/0023), integrado en la Red Española de Biobancos, tras la obtención del consentimiento informado y firmado de los pacientes. El protocolo para el establecimiento de estas líneas se detallará en apartados posteriores.

**Tabla 7:** Lista de líneas celulares empleadas en los diferentes estudios contenidos en el compendio

Línea celular	Eventos oncogénicos	Estado oncológico	Fenotipo	Referencia
BM-MSC	-	Derivada de paciente	Médula ósea: No tumoral	[216, 571, 572]
143B	-	Inmortalizada	Osteosarcoma	-
SAOS-2	-	Inmortalizada	Osteosarcoma	-
U2OS	-	Inmortalizada	Osteosarcoma	-
MG63	-	Inmortalizada	Osteosarcoma	-
G292	-	Inmortalizada	Osteosarcoma	-
MSC-4H-GFP	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + GFP	Transformada	Sarcoma (no crece tumor)	[216, 571, 572]
MSC-4H-FC	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + FC	Transformada	Liposarcoma mixoide	[216, 571, 572]
T-4H-FC#3	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + FC	Derivada de xenógrafo	Liposarcoma mixoide	[216, 573]
MSC-5H-GFP	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + H-RAS + GFP	Transformada	UPS	[216, 571, 572]
T-5H-0	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + H-RAS	Transformada	UPS	[216, 573]
T-5H-GFP#1	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + H-RAS + GFP	Derivada de xenógrafo	UPS	[216, 573]
MSC-5H-FC#1	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + H-RAS + FC	Transformada	Liposarcoma mixoide	[216, 571, 572]
T-5H-FC#1	TERT + E6 + E7 + SV40-ST + H-RAS + FC	Derivada de xenógrafo	Liposarcoma mixoide	[216, 573]
SARC-01	-	Derivada de paciente	Recidiva de osteosarcoma	-
SARC-03	-	Derivada de paciente	UPS	-
SARC-04	-	Derivada de paciente	Fibrosarcoma	-
SARC-06	-	Derivada de paciente	UPS	-
CDS-01	-	Derivada de paciente	CDS de bajo grado	[574]
CDS11	-	Derivada de paciente	CDS de bajo grado	[574]
CDS-17	-	Derivada de paciente	CDS no diferenciado de alto grado	[574]
T-CDS17#4	-	Derivada de xenógrafo	CDS no diferenciado de alto grado	[574]
OST3	-	Derivada de paciente	Osteosarcoma	-
OST4	-	Derivada de paciente	Osteosarcoma	-
HEK293T	-	Inmortalizada	Riñón de embrión	-
MOLM13	-	Inmortalizada	Leucemia mieloide aguda	-
Caco-2	-	Inmortalizada	Adenocarcinoma colorrectal	-
BCRP-MDKC	-	Inmortalizada	Riñón canino Madin-Darbi	-



### 2.1.2. Cultivo celular: Rutinas generales

**Condiciones del cultivo:** En la mayor parte de los casos, el cultivo de las líneas celulares se realizó en monocapa adherente sobre placas o frascos de cultivo estériles tratados para garantizar la adherencia celular (Corning) empleando como medio de cultivo DMEM con rojo fenol, 4,5 g/L de glucosa y 2 mM de L-glutamina (Corning) suplementado con suero fetal bovino previamente inactivado durante 45 minutos a 57°C (FBS, por sus siglas en inglés; Thermofisher Scientific) al 10%; Penicilina/estreptomicina (10000 ug/ml; Thermofisher Scientific) en relación 1:100; y Glutamax (100x; Thermofisher Scientific) en relación 1:100 (este medio recibirá en nombre de cDMEM). A modo de excepción, la línea celular MOML13 creció en condiciones no adherentes y fue cultivada con medio de cultivo RPMI 1640 con HEPES 25Mm (Corning) suplementado en las mismas condiciones que el DMEM. Todos los cultivos se mantuvieron en incubadores estériles a 37°C con una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Además, se comprobó mensualmente la ausencia de contaminación por micoplasma en los cultivos mediante el kit de detección “MycoAlert Mycoplasma Detection Kit” (Lonza, Rocnkland, CE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Pases:** Cuando las células de un cultivo crecen hasta colmar el espacio del que disponen, están sometidas a un alto estrés por proximidad unido al rápido desgaste y acidificación del medio de cultivo. Por este motivo es necesario realizar pases de cultivo cuando el crecimiento celular supera una confluencia en torno al 80-90%. En este proceso se elimina el medio de cultivo y se lavan las células con PBS (Corning), para posteriormente añadir tripsina 0,25% EDTA con rojo fenol (Gibco) e incubarlas de 2 a 5 minutos; provocando la separación de las células de la superficie del cultivo. Acto seguido, la tripsina es neutralizada con cDMEM y eliminada tras la centrifugación de las células a alrededor de 400 g durante 3 minutos. Las células precipitadas son entonces resuspendidas en medio de cultivo suplementado y cuantificadas en una cámara de Neubauer. Según la línea celular y el destino del cultivo, las células se cultivarán en la densidad que resulte de interés.

**Congelación y descongelación:** Las líneas celulares se almacenan congeladas, proceso que requiere un acondicionamiento adecuado de manera que se garantice la supervivencia celular. Dado que la congelación/descongelación de líneas celulares suele ser un procedimiento muy lesivo, la cantidad de células que deben almacenarse depende en gran

medida de su resistencia y capacidad de crecimiento y recuperación ante condiciones de estrés, aunque suelen ser cifras superiores a  $10^6$  células por vial. Tras la centrifugación de las células previamente levantadas y la eliminación del medio de cultivo, el pellet celular se resuspende en 1mL de cDMEM al que se ha añadido un 10% de DMSO y un 10% más de FBS; y se lleva a un criotubo estéril (Corning). El criotubo se introduce en una gradilla de congelación con isopropanol y se deja, al menos, 16h a  $-80^{\circ}\text{C}$  para garantizar la congelación gradual de la muestra. Finalmente, las líneas congeladas se trasladan a nitrógeno líquido ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) para su almacenamiento a largo plazo.

Dada la alta toxicidad del DMSO, la descongelación de las muestras para su cultivo debe ser un proceso muy rápido. Los viales congelados se introducen en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta la completa descongelación (unos 30 segundos), para luego ser resuspendidos y diluidos en unos 5 mL de cDMEM. Posteriormente las células se centrifugan y se sustituye el medio enriquecido en DMSO por cDMEM para, a continuación, establecer el cultivo en las condiciones que sean pertinentes.

### **2.1.3. Cultivo de esferas clonales**

En comparación con los cultivos en monocapa adherente, los cultivos de esferas clonales son altamente selectivos, de manera que se busca favorecer el crecimiento únicamente de aquellas subpoblaciones celulares con características asociadas a fenotipos CSCs. Una de ellas, es capacidad de crecimiento clonal sin existir ninguna adherencia a un sustrato. Para garantizar esta condición, el cultivo debe establecerse sobre placas comerciales tratadas para evitar la adherencia celular o sobre placas de cultivo normales recubiertas de poli-2-hidroximetacrilato (Poli-Hema. Sigma Aldrich). En este trabajo los cultivos se realizaron sobre placas de 6 pocillos en los que se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de una dilución 10 g/L de Poli-Hema en etanol al 95%. Posteriormente, las placas se dejaron secar a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 2 días, de manera que el compuesto formase una película adherida al fondo de cada pocillo. Además, las placas se semi-esterilizaron bajo luz ultravioleta durante 30 minutos antes de su uso.

Antes de establecer el cultivo es importante garantizar la completa disgregación de las células de modo las esferas de desarrollen verdaderamente de manera clonal. Por este motivo, las células provenientes de un cultivo adherente se pasaron a través de una malla de

70 micras (Thermofisher Scientific). A continuación, se realizó el cultivo de entre 1500 y 5000 células en por cada pocillo en las placas de 6 pocillos no adherentes, empleando como medio de cultivo 1,5 mL de medio DMEM F12 (Corning) suplementado con penicilina/estreptomicina 10000 U/mL 1:100, glutamax 1:100, FGF básico (Gold biotechnology, St Louis, Missouri, EEUU) y EGF (Gold Biotechnology) ambos a 1 µL/mL, suplemento B27+Vitamina A 50x (Thermofisher Scientific) a una dilución 1:50, y heparina 720 u/mL (Sigma Aldrich) a una dilución 1:1000 (medio de cultivo CSC). Se debe destacar la ausencia de FBS en el suplemento, lo que favorecerá la selección de subpoblaciones con capacidad de crecer en condiciones de estrés nutricional. Dada la inestabilidad de los factores de crecimiento, cada tres días se suplementó a cada pocillo con EGF y bFGF frescos a una concentración final de 1 µL/mL. Dependiendo la línea celular, el crecimiento de esferas clonales de un tamaño significativo (diámetros superiores o cercanos a las 100 micras) tardó de 10 a 12 días.

#### **2.1.4. Establecimiento de líneas primarias**

Para el establecimiento de líneas celulares derivadas de tejidos neoplásicos extirpados a pacientes, se siguieron varias estrategias. Por un lado, las muestras fueron disgregadas mecánicamente previo al tratamiento enzimático con 0,25 mg/mL liberasa (Roche) a 37°C durante 15 minutos y agitación cada 5 minutos. Por otro lado, algunas líneas fueron disgregadas mediante el kit de disociación de tejidos “MACS<sup>®</sup> Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) y el sistema de disociador “GentleMACS Dissociator System” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La suspensión con las células disgregadas fue diluida en cDMEM y filtrada con el fin de eliminar cualquier agregado. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en cDMEM fresco previo a su cultivo. Alternativamente, algunos tejidos fueron cortados con bisturí en trozos de pocos milímetros y transferidos a frascos de cultivo donde se cubrieron con una gota de CDMEM para dejarlas crecer en el incubador.

Para la diferenciación de las células neoplásicas de las estromales, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias en agar blando empleando el kit “CytoSelect<sup>™</sup> 96-Well Cell Transformation Assay Kit” (Cell Biolabs Inc, San Francisco, CA). Las células capaces de crecer independientemente de las condiciones de adhesión se supusieron transformadas. Estas colonias fueron recuperadas y cultivadas en adherencia en condiciones normales. La

identidad de las líneas establecidas se comprobó a lo largo de 5 meses mediante ensayos de repeticiones cortas en tándem (STR, por sus siglas en inglés) comparando sus perfiles genómicos con el tejido original del paciente. Además, resulta importante mencionar que, al igual que en el caso anterior, la línea nombrada como T-CDS17#4 ha sido derivada de un xenógrafo tumoral desarrollado en ratones inmunodeprimidos a partir de la línea CDS17.

### **2.1.5. Modificación de líneas celulares**

En este apartado se detallarán toda la metodología relacionada con la modificación genética de líneas celulares para la sobreexpresión o silenciamiento de determinadas dianas de interés.

#### **2.1.5.1. Plásmidos**

Todos los plásmidos empleados para la modificación genética de las líneas celulares descritas en este trabajo fueron diseñados para una transducción estable mediante el uso de partículas lentivirales. Los vectores lentivirales empleados a lo largo de este trabajo fueron: 1) Vector lentiviral que codifica el cDNA del dominio intracelular activo de NOTCH1 (NIICD)(EF.v-CMV.GFP;Addgene, ref 17623) para la sobreexpresión de esta diana así como un vector vacío (pWPI;Addgene,ref 12254) como control; 2) Vectores lentivirales que codifican shRNAs específicos de HES1 (SMARTvector Lentiviral shRNA, Refs: V3SH11240-225656557, nombrado como D9; y V3SH11240-226832480, nombrado como D10) para silenciar la expresión de esta diana; 3) Sistema lentiviral para reportar la expresión de SOX2 y/o OCT4 mediante el elemento SORE6 acoplado a un promotor “minCMV” asociado a la expresión de GFP (SORE6-mCMVp-dsCopGFP-Puro, las líneas modificadas con este plásmido se denominan con el sufijo -SORE6-GFP) así como un vector vacío como control negativo (mCMVp-dsCopGFP-Puro, las líneas modificadas adquieren el sufijo -minCMV-GFP) descritos en trabajos previos [42] y donados por el doctor L.M. Wakefield (National Cancer Institute, Bethesda, MD).

#### **2.1.5.2. Amplificación del plásmido**

La amplificación de los plásmidos para obtener una concentración de ADN suficientemente alta para elaborar la modificación de las líneas celulares se realizó mediante la transformación de la cepa TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).

El cultivo de estas bacterias se llevó a cabo en medio LB (Sigma Aldrich) compuesto por Triptona (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (5 g/L), y glucosa (1 g/L). En el caso de cultivos sólidos sobre placas Petri (Corning), se añadió al medio de cultivo agar al 1,5 %. En ambos casos, la dilución de LB fue previamente autoclavada a 120°C durante 40 minutos.

Como primer paso para la transformación, resulta necesario hacer que las bacterias sean competentes, es decir, permeabilizar su membrana celular a la entrada de los plásmidos. Una forma de hacerlo es mediante un choque térmico en un medio de cultivo con cationes divalentes, principalmente calcio. De esta manera, se incubó un inóculo de bacterias a 37°C y agitación durante toda una noche para, al día siguiente, añadir el volumen necesario del cultivo a 100 ml de LB fresco para conseguir una densidad óptica alrededor de 0,4 unidades de absorbancia. Este cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 1600 g y 4°C. El precipitado se resuspendió en una solución de CaCl<sub>2</sub> 60 mM previamente enfriada a 4°C y se repitió la centrifugación una vez más. Finalmente, el precipitado celular fue resuspendido en una solución CaCl<sub>2</sub> 60 mM y un 15% de glicerol, esta vez a temperatura ambiental. Las bacterias en este punto ya son competentes, por lo que pudieron almacenarse en alícuotas de 100 µL a -80°C.

Para la transformación, las bacterias fueron descongeladas durante 7 minutos en hielo previo a la inoculación del plásmido. La cantidad de ADN introducido puede estar alrededor de los 100 ng en adelante. Tras este paso, las bacterias fueron incubadas en hielo durante 30 minutos para luego inducirles un shock térmico de 42°C durante 45 segundos. Tras esto, se añadió 1 mL de LB fresco con el que se sembraron, por agotamiento, placas de LB sólido al que se le había añadido el antibiótico de selección pertinente. El objetivo de este paso es obtener en el intervalo de 12 a 24 horas de incubación a 37°C colonias de bacterias aisladas que luego llevar a un cultivo de LB líquido con antibiótico, de manera que se garantice la selección de un único clon bacteriano que haya integrado el plásmido. De esta manera, la colonia aislada se incubó durante toda una noche en agitación y a 37°C en entre 3 y 5 ml de LB fresco con antibiótico.

### **2.1.5.3. Conservación del cultivo bacteriano**

Normalmente, una porción del cultivo amplificado en el apartado anterior se destina al almacenamiento de un stock de células transformadas. Para ello, la fracción de interés (normalmente ¼ parte del cultivo por muestra congelada) se separa del cultivo y se

centrifuga durante 10 minutos a 1600 g. El precipitado celular es resuspendido en 750  $\mu$ L de LB con antibiótico y 750  $\mu$ L de glicerol al 50% previamente esterilizado; para su almacenamiento en crioviales a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.5.4. Extracción del ADN amplificado**

La extracción del ADN plasmídico a partir de un cultivo bacteriano amplificado se realizó mediante el kit de extracción “HiPure PureLink™ Midiprep Kit” (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La cantidad de ADN en las muestras fue medida mediante la adquisición de la absorbancia en el sistema de cuantificación de material genético “NanoDrop 2000™” (ThermoFisher Scientific).

#### **2.1.5.5. Transfección transitoria**

La transfección de las líneas celulares con plásmidos no recombinantes, es decir, que permanecerán en el citoplasma celular expresándose de manera temporal, se llevó a cabo mediante el método de lipofección con “Lipofectamina 3000” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En términos generales, la transfección se realizó sobre líneas celulares cultivadas en placas de 6 pocillos en una confluencia en torno al 70% en la que, previo al procedimiento, se añadió 1 mL cDMEM sin FBS. A partir de esto, se preparó una primera mezcla con 3,75  $\mu$ L de Lipofectamina 3000 en 125  $\mu$ L de Opti-MEM® (Gibco) por pocillo transfectado. Posteriormente, se realizó una segunda preparación con el plásmido de interés (entre 0,5 y 5  $\mu$ g de DNA), 2  $\mu$ L de reactivo de transfección P3000 por  $\mu$ g de ADN, y 125  $\mu$ L de Opti-MEM®, una vez más, por pocillo transfectado. A continuación, se añadió la segunda mezcla sobre la primera y se dejó incubar durante 5 minutos. Para finalizar, se añadieron 250  $\mu$ L de la mezcla gota a gota sobre los pocillos del cultivo celular. A partir de las 4-6 primeras horas tras la transfección, se puede cambiar el medio por cDMEM fresco.

#### **2.1.5.6. Modificación genética mediante infección con partículas lentivirales**

La modificación genética de líneas celulares se llevó a cabo mediante el uso de vectores recombinantes introducidos por transducción lentiviral con un sistema de empaquetamiento viral de tercera generación. El primer paso de este procedimiento conlleva la cotransfección de una línea celular con alta actividad catabólica como es la línea HEK-293T, tanto con el plásmido de interés como con los plásmidos que codifican las diferentes proteínas que

componen la cápsula vírica. En todos los casos incluidos en este trabajo, los plásmidos víricos empleados fueron PLP1 (2250 ng por pocillo), PLP2 (1500 ng por pocillo) y VSVG (2100 ng por pocillo). De esta manera, dentro de estas células se induce el ensamblaje de partículas virales a partir de la expresión de las subunidades que las componen y que, además, contendrán el plásmido diana, lo que llevará su introducción en el genoma de una nueva línea celular infectada por estos virus por recombinación.

Una vez realizada la cotransfección sobre las células HEK-293T, se cambió el medio de transfección por medio fresco a las 6 horas. Tras 48 horas de producción de virus, se recolectó este medio de cultivo y se eliminó cualquier resto de las células productoras mediante el centrifugado y el posterior filtrado del medio en un filtro HEPA de 0,45 micras. Para finalizar, se añadió este medio filtrado a un cultivo celular en placas de 6 pocillos de la línea celular que fuese a ser transformada, cambiándose por medio fresco a las 24 o 48 h de exposición.

Una vez culminado el proceso de infección, la línea celular transformada fue amplificada en cultivo y se seleccionaron aquellas subpoblaciones que expresaban el plásmido en base al marcador de selección pertinente en cada caso. En este trabajo, el marcador de selección predominante fue la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), las poblaciones celulares transformadas se sortearon en base a la emisión de fluorescencia verde mediante citometría de flujo haciendo uso del citómetro “BD FACS ARIA II Cell Sorter” (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium).

Resulta importante mencionar que todos los experimentos relacionados con la manipulación de lentivirus activos, se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas de seguridad exigidas en para la manipulación de este tipo de agentes.

## **2.2. Ensayos sobre cultivos celulares**

Una vez establecidas las bases fundamentales con respecto a los cultivos celulares sobre los que se realizaron los diferentes ensayos incluidos en este trabajo; en este apartado se profundizará en dichos análisis.

Resulta importante mencionar que todos los experimentos aquí citados se han realizado, al menos, en tres ocasiones de manera independiente de cara obtener resultados

estadísticamente fiables. Además, el análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos, así como la representación gráfica de los mismos se realizó con el software “GraphPad Prism” versión 8.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, California, EEUU).

### **2.2.1. Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad de las líneas celulares en presencia o ausencia de los distintos compuestos citotóxicos testados en cada estudio fue analizada a través de varias metodologías, incluidas en este apartado.

#### **2.2.1.1. Ensayo WST-1**

Por un lado, la fracción de células supervivientes en cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de agentes antitumorales se cuantificó empleando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche, Mannheim, Germany). Este ensayo colorimétrico se basa en cuantificar la proliferación celular en base a la actividad metabólica de un cultivo, más específicamente a la producción de NAD(P)H. De esta manera, un cultivo expuesto a este reactivo mostrará un viraje en el color del medio de cultivo proporcional a la actividad metabólica del mismo.

En los ensayos incluidos en este trabajo, el análisis WST-1 se realizó sobre placas de cultivo de 24 pocillos en los que el día anterior se había plaqueado la línea celular de interés según el estudio. La cantidad de células por pocillo plaqueadas en cada ensayo varía considerablemente según su capacidad proliferativa, estando entre las 5.000 células (por ejemplo, en 143B) y las 25.000 (por ejemplo, en la línea primaria OST3). En cada placa de cultivo se pusieron a prueba un intervalo de hasta 7 concentraciones diferentes de agente citotóxico y un control al que se añadió DMSO (o, en el caso de la MTA encapsulada, nanocarriers vacíos) en un volumen similar al introducido con el tratamiento; añadiendo 0,5 mL de cDMEM con el compuesto por pocillo. Además, cada tratamiento se realizó en tres pocillos a modo de triplicados técnicos. Una vez añadido el compuesto citotóxico, las placas se dejaron en incubación durante, según el experimento, 48 o 72 h. Pasado este periodo, se retiró el medio de cultivo con el agente citotóxico y se añadieron 200  $\mu$ L de cDMEM con una concentración 18  $\mu$ L/ml de reactivo WST-1. El cultivo se dejó en incubación entre 30 y 90 minutos (según la actividad metabólica y concentración del cultivo) previo a su



cuantificación tomando la absorbancia a 444 nm en el lector de placas “Synergy HT” (BioTek, Winooski, Vermont, EEUU).

#### **2.2.1.2. Capacidad de formación de colonias**

En este ensayo se establece un cultivo de manera que se favorezca la adhesión a la placa de cultivo de células espacialmente aisladas. El efecto del agente citotóxico sobre el cultivo se evalúa observando la capacidad de proliferar de las diferentes células aisladas generando colonias de crecimiento delimitadas tras la exposición al mismo. En este trabajo, se plaquearon entre 1000 y 5000 células (dependiendo la línea celular) en 6 mL de cDMEM sobre placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro. Las placas se dejaron en incubación, dependiendo de la línea celular, entre 4 y 12 h, considerando el tiempo justo para que las células se adhiriesen a la placa pero que no hubiesen empezado la división celular. Acto seguido, se añadió 1 mL de cDMEM con el tratamiento (incluyendo un control con DMSO) 7 veces concentrado con respecto a la concentración final deseada. Tras 24 h de incubación, el medio con el tratamiento fue sustituido por cDMEM fresco para posteriormente dejar las placas en incubación hasta la formación de colonias visibles al microscopio. El periodo necesario para la obtención de colonias fácilmente medibles varía según la capacidad proliferativa de la línea celular, tomando de media unos 10 días.

Una vez desarrolladas las colonias, estas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta (Sigma Aldrich). Para ello, se retiró el cDMEM y se realizaron 3 lavados con 5 mL de PBS previamente enfriado a 4°C. A continuación, las colonias fueron fijadas con 5 mL de metanol previamente enfriado a -20°C durante 10 minutos. Para acabar, se retiró el metanol y se añadieron 5 mL de una solución de metanol al 20% en agua con cristal violeta al 0,5%, durante 10 minutos. Finalizado este periodo, se retiró el cristal violeta y se lavaron las placas con agua. De esta manera, las diferentes colonias quedaron teñidas con el cristal violeta y, tras dejarlas secar durante 24 h en condiciones ambientales, se pudieron fotografiar para posteriormente realizar el conteo del número de colonias formado para cada tratamiento.

#### **2.2.1.3. Proliferación a tiempo real**

La monitorización a tiempo real del crecimiento de diferentes líneas celulares se realizó con el sistema “RTCA iCELLigence™” (Agilent Technologies), el cual mide la variación en la impedancia magnética en electrodos situados en el fondo de una placa de cultivo específica

del instrumento al cubrirse conforme aumenta la confluencia del cultivo dentro de un incubador. Este sistema permite estudiar la capacidad proliferativa de las diferentes líneas y construcciones celulares en cultivo, además de evaluar a tiempo real la respuesta a distintos tratamientos, así como la recuperación de las células tras la exposición a los mismos. En este trabajo se ha llevado a cabo la última de estas aplicaciones. Para ello, se emplearon placas de 8 pocillos poniendo duplicados técnicos en los que, inicialmente, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de cDMEM a modo de blanco. Posteriormente, se plaquearon entre 1500 y 5000 células, según la línea celular, añadiendo unos 450  $\mu\text{L}$  a cada pocillo dejándolas crecer de 24 a 72 horas (según el experimento) en un incubador para conseguir una confluencia celular entre el 50 y el 60 %. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cDMEM con el agente citotóxico (incluyendo un control con DMSO) 7 veces concentrado para alcanzar la concentración final deseada en cada pocillo. Posteriormente, el medio con tratamiento fue sustituido a las 48 h con cDMEM fresco teniendo en cuenta que el pocillo nunca debe quedar completamente seco, por lo que el medio de tratamiento se retiró en varias etapas en las que se extrajeron unos 500  $\mu\text{L}$  de medio con tratamiento y se añadieron otros tantos de medio fresco varias veces. Finalmente, los cultivos se dejaron crecer durante dos semanas antes de parar el experimento y recopilar los datos. La recopilación de los datos se realizó en el software vinculado al mismo instrumento “RTCA Data Analysis Software 1.0” mientras que tratamiento posterior de los datos se realizó con el GraphPad Prism.

#### **2.2.1.4. Sinergia en tratamientos combinados**

La interacción entre los diferentes agentes citotóxicos añadidos de manera combinada en un mismo tratamiento fue estudiada a través del cálculo del Índice de Combinación (IC) en el software CompuSyn (ComboSyn) según el método de Chou y Talalay [575]. Para ello, se calculó la fracción de células afectadas por el tratamiento medida en varios ensayos WST-1 en los que se testaron de 6 a 7 combinaciones de los compuestos estudiados en cada caso, empleando una ratio fijada a partir del  $\text{IC}_{50}$  de los mismos en el software mencionado.

En términos generales, el valor del CI determinará el tipo de interacción entre compuestos, de manera que un CI inferior a 1 indica sinergia; uno cercano a 1 indica un efecto aditivo; y uno superior a 1 indica una interacción antagonista.

### 2.2.2. Ensayos de toxicidad en esferas clonales

En lo respectivo a los cultivos de esferas clonales enriquecidas en subpoblaciones CSCs, se realizaron dos tipos de ensayos para caracterizar el efecto de los diferentes agentes citotóxicos sobre estas subpoblaciones. Las condiciones fundamentales para el establecimiento de estos cultivos se detallaron en el **Capítulo 2** apartado **2.1.3**.

Por un lado, se establecieron tratamientos sobre cultivos de esferas ya formadas de cara a determinar el efecto directo del compuesto sobre las subpoblaciones CSCs. Para ello se añadió un volumen necesario de medio de cultivo CSC en cultivos de esferas ya crecidas con el tratamiento concentrado hasta alcanzar los 2 mL de medio por pocillo con una concentración de compuesto deseada. Los tratamientos se repitieron en tres pocillos con la finalidad de establecer triplicados técnicos. Tras la adición de los agentes citotóxicos, las placas fueron incubadas durante 72 h, momento en el que se realizó el conteo del número total de esferas en cada pocillo empleando el microscopio “Leica DM IL” (Leica, Wetzlar, Alemania). Además, se obtuvieron imágenes representativas de cada pocillo con la cámara integrada al microscopio “Leica MC120 HD” (Leica). A continuación, las esferas de cada uno de los pocillos fueron filtradas, centrifugadas y disgregadas con tripsina para a continuación cultivarlas en placas de 24 pocillos. Una vez adheridas tras unas 4 horas de incubación, se realizó un ensayo WST-1.

De manera alternativa, se establecieron cultivos de esferas a partir de cultivos en adherencia previamente tratados durante 48 h con el compuesto de interés de cara a caracterizar el efecto inhibitorio que el compuesto mencionado presenta sobre la expresión de características asociadas a CSCs. Para ello, las células tratadas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> fueron levantadas con tripsina y contabilizadas tras la adición de azul de tripano (Gibco) al 0,5% a una alícuota del cultivo para marcar y evitar contabilizar las células no viables. A partir de aquí, se estableció un cultivo de esferas clonales en las condiciones típicas poniendo triplicados técnicos por tratamiento. Dichos cultivos se dejaron en incubación hasta la formación, unos 10 días después, de las esferas; momento en el que se realizó un análisis similar al experimento anterior.

En ambos experimentos, tanto los valores de esferas contabilizadas como los resultados de los ensayos WST-1 fueron procesados en el GraphPad Prism.

### **2.2.3. Ensayos de invasión de esferoides en tres dimensiones**

El análisis sobre el efecto de los diferentes agentes citotóxicos en la capacidad invasiva de diferentes líneas fue analizado en cultivos tridimensionales de esferoides. Para ello se suspendieron en cDMEM con un 5% de metil celulosa (Sigma Aldrich) unas 80000 células por mL para luego depositar la suspensión cuidadosamente sobre la tapa de una placa Petri no tratada para adhesión celular en gotas de 25  $\mu$ L. Dichas gotas fueron incubadas en una posición invertida durante 18 horas añadiendo PBS sobre el fondo de la placa Petri evitando así el secado de las gotas. A continuación, cada esferoide se transfirió a un pocillo individual de una placa de 96 pocillos en el que se habían añadido 70  $\mu$ L de una matriz con 3 mg/mL de colágeno bovino tipo I (Purecol; Advanced Biomatrix, San Diego, California, EEUU). Tras 2 horas de polimerización del colágeno a 37°C, se añadieron 100  $\mu$ L de cDMEM con los diferentes tratamientos. En cada experimento se incluyeron, al menos, tres réplicas de cada condición experimental. El proceso de invasión iniciado en cada esfera fue monitorizado usando un microscopio invertido de célula viva “Zeiss Cell Observer Live Imagin microscope” (Zeiss, Thornwood, Nueva York, EEUU) acoplado a una cámara de incubación con un sistema de control de CO<sub>2</sub> que permite el mantenimiento de una atmósfera al 5%, 37°C de temperatura y condiciones de humedad. Las imágenes fueron adquiridas en intervalos de 15 minutos durante 24 horas usando la cámara integrada al microscopio “Zeiss AxioCam MRc camera” (Zeiss). El área de invasión se determinó calculando la diferencia entre el área de la esfera de invasión en el tiempo final y el área inicial medida a tiempo 0 usando el software libre “ImageJ” (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, Maryland, EEUU), normalizando las áreas de cada condición con respecto al de las células control.

### **2.2.4. Detección de GFP por citometría de flujo**

Los niveles de expresión de GFP en las diferentes construcciones celulares como es el caso de SORE6, se analizó a través de citometría de flujo en muestras previamente tratadas sobre cultivos celulares adherentes a concentraciones y tiempos variados con los compuestos de interés. Tras levantar cada muestra previa al análisis, estas fueron centrifugadas y resuspendidas en cDMEM con EDTA 2  $\mu$ M, para posteriormente ser extruidas sobre una malla favoreciendo la dispersión de las células. Posteriormente los niveles de fluorescencia verde fueron analizados en el citómetro BD FACS Aria II Cell Sorter. En el caso de la línea celular SORE6, la línea control de este plásmido fue empleada para establecer los niveles

basales de GFP no asociado a la expresión de SOX2 u Oct4 en la línea transformada. Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el software libre Cyflogic ([www.cyflogic.com](http://www.cyflogic.com)).

### **2.2.5. Análisis de integración de nanopartículas**

Para el análisis de la interacción entre algunos de los nanotransportadores diseñados en este trabajo y células expuestas a los mismos, se introdujo en la composición de la membrana de las PNP de PLGA un 1% de fosfatidilcolina marcada en su región polar con el fluoróforo Cy5 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EEUU). Por otro lado, se establecieron cultivos celulares sobre portaobjetos diseñados específicamente para la observación de cultivos vivos en microscopios invertidos de fluorescencia a través de un polímero específico que conforma el substrato del pocillo (Ibidi, Gräfelfing, Alemania). Estas células fueron tratadas con las PNP marcadas con Cy5 durante 6 horas previo a su observación en el microscopio confocal “Leica TCS-SP8X microscope” (Leica). La detección de MTM se realizó en el par de excitación/emisión de 395/535 nm mientras que el Cy5 se observó a 649/666 nm.

### **2.2.6. Análisis del ciclo celular**

El análisis el estado replicativo en la que se encuentran las células de cultivos tratados previamente con los compuestos de interés, se realizó mediante la detección en un citómetro de flujo de células previamente marcadas con un agente fluorescente con capacidad de intercarse en el ADN como es el yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés; Sigma Aldrich). Las células tratadas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con una confluencia en torno al 80% fueron levantadas, centrifugadas y lavadas con PBS previo a ser fijadas con etanol al 70% enfriado a -20°C, que fue añadido gota a gota directamente sobre el pellet celular hasta su completa disgregación. Acto seguido, se realizaron 3 lavados con PBS previo a la incubación durante 30 minutos con 400 µL de una solución 50 µg/mL PI y 100 µg/mL de RNasa A (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Acto seguido, los núcleos teñidos fueron analizados en el citómetro BD FACS ARIA II Cell Sorter y los resultados analizados con Cyflogic.

### **2.2.7. Daño a nivel genómico: Inmunofluorescencia**

El daño genómico acumulado en líneas celulares tratadas con algunos de los compuestos empleados en este trabajo se analizó mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos contra la histona YH2AX (ser139; ref 05-636; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU), la cual se une a roturas de doble cadena en el ADN. Para ello, se incubaron y trataron las líneas celulares en placas de cultivo de 6 pocillos de a los que se añadieron cubreobjetos en el fondo de cada pocillo, de manera que las células crecieran sobre los mismos. Tras finalizar el tratamiento los cubreobjetos fueron cuidadosamente lavados 3 veces con PBS para proceder a la fijación durante 20 minutos con formaldehído al 4%. A continuación, los cubreobjetos con las células fijadas fueron lavados durante 5 minutos dos veces con PBS. En este punto, las células fijadas pudieron ser almacenadas a 4°C en PBS con seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés; VWR Chemicals, Radnor, Pensilvania, EEUU) al 1%.

El siguiente paso conllevó la permeabilización de las células con una solución al 0,2 % de Tween 20 durante 5 minutos a 4°C. Tras 3 lavados más con PBS, las muestras fueron bloqueadas en agitación durante 2 horas en condiciones ambientales con una solución al 5% de BSA y 0,1 % de Tween 20. Acto seguido se preparó una dilución del anticuerpo anti-YH2AX (ser139) 1:500 en BSA al 5% con la que se incubaron los cubreobjetos con las células fijadas durante 2 horas en agitación y condiciones ambientales; o bien toda una noche a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados con una solución al 0,1% de Tween 20 en PBS y se incubaron durante 1 hora en agitación y oscuridad en condiciones ambientales con una dilución 1:300 en BSA al 5% de un anticuerpo secundario contra anticuerpos primarios de ratón marcado con el fluoróforo “Alexa Fluor 555” (ref A-21422; Thermofisher Scientific). Tras otros 3 lavados de 10 minutos en oscuridad, agitación y condiciones ambientales, se procedió a montar los cubres sobre portaobjetos empleando medio de montaje con DAPI (Sigma Aldrich) para el marcaje de los núcleos celulares. Finalmente, se obtuvieron imágenes de las muestras fluorescentes empleando tiempos de exposición similares en cada caso con el microscopio “Zeiss-ApoTome Cell Observer Live Imaging microscope” (Zeiss) acoplado a una cámara “Zeiss AxioCam MRc camera”.

### **2.2.8. Interacción con las bombas ABC**

La interacción de diferentes compuestos con las bombas ABC fue caracterizada en un sistema de absorción (Exton, Pensilvania, EEUU) empleando cultivos adherentes en

confluencia cultivados sobre placas de cultivo de policarbonato microporosas de 12 pocillos recubiertas de colágeno “Costar® Transwell” (Corning). A modo de buffer de permeabilidad se empleó solución salina balanceada de Hanks con HEPES 10 mM y glucosa 15 mM a un pH de 7,4. Considerante estas condiciones comunes, se realizaron tres tipos de ensayos.

### 2.2.8.1. Sustrato de ABCB1/MDR1 y ABCG2/BCRP1

En este ensayo se evaluó si los inhibidores testados eran sustrato de las bombas ABC más representativas y, por lo tanto, susceptibles de ser expulsados estas.

Inicialmente, las células fueron incubadas durante 30 minutos con HBSS con 1  $\mu$ M de Valspodar o 0,5  $\mu$ M de Ko143 en una celda de difusión. A continuación, las células fueron tratadas en la región apical y basolateral de la celda con una dilución de HBSS con los inhibidores de ABC y los agentes de interés o con digoxina (sustrato de ABCB1) y cladribidina (sustrato de ABCG2) 10  $\mu$ M, como controles positivos para posteriormente dejarlas en incubación. Las muestras fueron sacadas de la celda de difusión tras 120 minutos. Además, se empleó un flujo de amarillo lucifer para detectar cualquier posible daño a la monocapa cultivada durante la exposición a los flujos de tratamiento.

Una vez culminado este ensayo, repetido por duplicado, las muestras fueron extraídas y analizadas mediante cromatografía líquida vinculada a un espectrómetro de masas en tándem con ionización por electrospray.

La permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y el porcentaje de recuperación de los diferentes compuestos se calculó según las ecuaciones:

$$EQ3: P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_A}$$

$$EQ4: \% \text{ Recuperación} = 100 \times \frac{V_r \times C_r^{final} + V_d \times C_d^{final}}{V_d \times C_N}$$

Donde “ $\frac{dC_r}{dt}$ ” es la pendiente de la concentración acumulativa en el compartimento receptor contra el tiempo en  $\mu$ M/s; “ $V_d$ ” es el volumen del compartimento donante en  $\text{cm}^3$ ; “ $V_r$ ” el volumen del compartimento receptor en  $\text{cm}^3$ ; A es el área del cultivo insertado (1,13  $\text{cm}^2$  en el caso de las placas de 12 pocillos empleadas); “ $C_A$ ” es la concentración de dosis nominal media y la concentración donada medida en  $\mu$ M; “ $C_N$ ” es la concentración nominal de la

dosis en  $\mu\text{M}$ ; " $C_r^{final}$ ," es la concentración acumulativa en el receptor en  $\mu\text{M}$  al final de la incubación; y " $C_d^{final}$ ," es la concentración donada en  $\mu\text{M}$  al final de la incubación. Además, la relación de flujo se definió como  $P_{app}$  de una cámara a la otra /  $P_{app}$  en el sentido contrario.

#### **2.2.8.2. Inhibición de ABCB1/MDR1 y ABCG2/BCRP1**

En este caso, también se empleó digoxina 10  $\mu\text{M}$  como control positivo, añadiéndose el compuesto de interés a una concentración 10  $\mu\text{M}$ , Valspodar 1  $\mu\text{M}$  (para el caso de ABCB1) o Ko143 0,5  $\mu\text{M}$  (para analizar la inhibición de ABCG2) como tratamientos. Tras una incubación inicial similar al ensayo anterior, se establecieron los tratamientos en la región apical o basolateral de la cámara de difusión. El resto de pasos fue similar al caso anterior, obteniéndose la permeabilidad aparente se calculó con la siguiente ecuación:

$$EQ5: P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_N}$$

Y el porcentaje de recuperación según la **EQ4**. La ratio de flujo se determinó como en el caso anterior.



### **3. Experimentos de crecimiento tumoral *in vivo* y análisis histológicos.**

Todos los protocolos experimentales sobre modelos animales se han realizado de acuerdo a las directrices institucionales de la Universidad de Oviedo siendo aprobadas por el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

Con respecto a las muestras de tejido derivadas de pacientes oncológicos y a sus datos clínicos, estos fueron cedidos por el Biobanco del Principado de Asturias (PT17/0015/0023), integrado en la red nacional de Biobancos española; siendo procesadas según los procedimientos debidamente aceptados por los comités éticos y científicos pertinentes. Además, todas las muestras de tejido fueron obtenidas con el consentimiento informado del paciente.

#### **3.1. Inoculación y tratamiento de tumores en modelos animales**

Los modelos animales empleados en los diferentes procedimientos desarrollados en este trabajo fueron ratones hembra NOD/SCID de alrededor de 6 semanas de edad (Janvier Labs, St Berthevin, Francia). Todos los ratones fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos, alimentados en condiciones *ad libitum*, en las instalaciones Bioterio de la Universidad de Oviedo de acuerdo a la normativa vigente.

En todos los casos, las diferentes líneas celulares fueron inoculadas por vía subcutánea en los flancos derecho e izquierdo del ratón, considerando un número de células dependiente del ensayo y el tipo celular. Para ello, las células fueron introducidas en una solución de matrigel (BD Biosciences, San Jose, California, EEUU) para evitar la dispersión celular y favorecer el implante del xenógrafo. La solución de matrigel se almacena a -20°C y se descongela en hielo a 4°C durante toda una noche el día antes a la inoculación. Una vez descongelado, la solución es diluida 4 veces con cDMEM mezclándolas además con la cantidad de células deseada y pasándolas por un filtro de nylon de 70 micras (BD Biosciences) para deshacer cualquier agregado celular. Para evitar la polimerización del matrigel, las muestras debieron mantenerse en hielo hasta antes de la inyección.

En el caso de la línea T-5H-FC#1 inoculada en el **Artículo 1**, se inyectaron  $2 \times 10^6$  células en 100  $\mu\text{L}$  de matrigel y se monitorizó el crecimiento del tumor tomando medidas con un calibre hasta alcanzar unos 200-300  $\text{mm}^3$ . En ese momento los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos control o tratamiento y se inició el régimen de tratamiento

administrando el agente antitumoral o un suero fisiológico en el caso de los controles por vía intravenosa empleando la vena lateral de la cola del animal. De manera diaria, la evolución del tumor y del animal fue monitorizada analizando el peso del animal y el volumen de la neoplasia.

Una vez los tumores de los animales control alcanzaron los 1000 mm<sup>3</sup> o se observó una pérdida de peso significativa en los animales, se paró el experimento realizándose la eutanasia de los animales por asfixia en una cámara de CO<sup>2</sup>. Posteriormente, los tumores fueron extraídos quirúrgicamente, pesados y medidos con el calibre. El volumen del tumor se determinó según la ecuación:

$$EQ6: V_t = \frac{D \times d^2}{6} \times 3,14$$

Donde “D” es el diámetro máximo del tumor y “d” el mínimo. De esta manera, los volúmenes de cada grupo experimental se unieron de cara a sacar el promedio del grupo y posteriormente explorar la posible existencia de significación estadística entre las diferencias de los grupos mediante un ensayo “t de student”. La eficacia del tratamiento se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%TGI, por sus siglas en inglés) mediante la ecuación:

$$EQ7: \%TGI = 100 - \left(\frac{T}{C}\right) * 100$$

Donde “T” es el volumen relativo del tumor (RTV, por sus siglas en inglés; calculado mediante la resta del volumen del tumor al inicio del tratamiento al volumen final) del tumor tratado; y “C” les la RTV media del grupo control.

Tras el pesado de los tumores extraídos, estos fueron procesados para el análisis histológico tal y como se describirá en el siguiente apartado. Por otro lado, una sección del tumor fue destinada a la preparación de extractos de proteínas de cara a analizar el perfil de expresión del tejido neoplásico. Para ello, el tumor fue disgregado con el sistema de disociación “GentleMACS Dissociator system” empleando como medio de lisis una solución de Tris-base 20mM (Thermofisher Scientific), NaCL 140 mM, EDTA 50 mM, Glycerol 10%, Novidet P-40 1%, PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, cócteles inhibidores de fosfatasas 2 y 3 (Sigma Aldrich), y coctel inhibidor de proteasas “Complete” (Sigma Aldrich) al 1%.

La significancia estadística de las diferencias entre grupos experimentales se analizó mediante un test T de Student a dos caras. Las comparaciones entre múltiples grupos se desarrolló mediante un ANOVA unidireccional considerando el test de Turkey con  $p$ value crítico  $< 0,05$ .

### **3.2. Análisis histológico**

#### **3.2.1. Preparación de los cortes**

Las muestras de tejido tumoral extraídas de los modelos animales fueron fijadas en formol tamponado al 10% (Sigma Aldrich) durante unas 2 horas por cada  $\text{cm}^3$ . Posteriormente fueron embebidas en parafina, proceso que conlleva la introducción de las muestras en cestillas histológicas para su deshidratación con un gradiente creciente de concentraciones de etanol, desde el 50% al 100%. A continuación, se colocó la muestra en un molde metálico que fue rellenado con parafina líquida que luego se dejó enfriar.

El bloque de parafina obtenido fue entonces enfriado durante 20 minutos a 4 grados para endurecerlo, favoreciendo así su microdissección en un micrótopo en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes seriados se depositaron en un baño de agua suplementado con etanol absoluto al 45%, lo que evitó la formación de pliegues en el corte. Los cortes fueron entonces recogidos con un portaobjetos en el que se dejaron a 37°C durante una noche con el objetivo de favorecer la adhesión al portaobjetos.

Una vez fijadas las muestras al portaobjeto, estas fueron introducidas en xilol durante 30 minutos para eliminar la parafina. Luego, los cortes fueron introducidos en varias diluciones de etanol con un gradiente decreciente de etanol desde el 50% a agua destilada, de manera que se rehidrató la muestra.

En el caso de las histologías de pacientes, las matrices de tejido (TMA, por sus siglas en inglés) empleados en este estudio fueron elaborados por el Biobanco del HUCA previa obtención del consentimiento informado de los pacientes.

#### **3.2.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina**

Una parte de las secciones obtenidas, fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E). La hematoxilina tiende a unirse a estructuras ácidas como el núcleo celular debido a su naturaleza catiónica, dando tonos azulados/púrpura. La eosina, al contrario, tiende a unirse

a estructuras más básicas como el citoplasma por su naturaleza aniónica, tiñendo las muestras de un tono rosáceo.

La tinción se llevó a cabo sumergiendo las secciones en hematoxilina durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con abundante agua y se trasladaron rápidamente a un recipiente con alcohol ácido, un decolorante compuesto por 3% de HCL concentrado y un 97% de etanol al 95%. El siguiente paso conllevó sumergir la muestra en eosina durante 30 segundos para posteriormente exponerlas a un gradiente creciente de etanol desde el 50% al 100% para volver a deshidratar las muestras. Luego, se mantuvieron 10 minutos en xilol. Finalmente, las muestras se dejaron secar y se analizaron en un microscopio óptico.

A partir de las secciones teñidas con este método, fue posible obtener el grado tumoral aplicando el sistema de clasificación en tres grados de la Federación Francesa de Centros Oncológicos Integrales (FNCLCC, por sus siglas en inglés). Este sistema parte de la puntuación acumulativa en histologías neoplásicas en base a tres factores: el nivel de diferenciación tumoral (de 1 a 3 de mayor a menor grado de diferenciación); la presencia de necrosis (siendo 0 ausencia de necrosis, 1 menos de un 50% del tejido y 2 más de un 50% del tejido); y el conteo mitótico (siendo 1 de 0 a 9 células mitóticas contabilizadas en un campo de alta potencia (HPF, por sus siglas en inglés, 40x); 2 de 10 a 19 mitosis; o 3 más de 20). Así, una puntuación de 2 a 3 equivale a un grado I, de 4-5 un grado II y de 6 a 8 a un grado III.

### **3.2.3. Inmunohistoquímica**

La expresión de diferentes dianas en las secciones de tejido tumoral extraídas tanto de modelos animales como de histologías de pacientes se puede analizar mediante el marcaje inmunohistoquímico. De esta manera, es posible marcar zonas en las que se encuentran proteínas específicas incubando las secciones con anticuerpos primarios contra estas, que posteriormente serán vinculados a anticuerpos secundarios marcados con la enzima peroxidasa, capaz de procesar la diaminonitrofenol (DAB) adquiriendo un color marrón. En la **Tabla 9** mostrada en el posterior apartado **4.1.1** se muestran los anticuerpos primarios empleados para el marcaje inmunohistoquímico de dianas concretas.

El proceso para realizar este marcaje se inicia eliminando la peroxidasa endógena que pueda estar presente en cada sección, evitando falsos positivos. Para ello, se trataron las muestras

con una solución de bloqueo de peroxidasa comercial (Agilent Technologies) durante 5 minutos en condiciones ambientales, lavando posteriormente con PBS las muestras. Acto seguido, se incubaron con suero animal (dependiente del hospedador del anticuerpo secundario) durante una hora, de cara a minimizar las uniones inespecíficas de este.

A continuación, los cortes fueron incubados con los distintos anticuerpos primarios en una cámara húmeda durante 1 h, lavadas con PBS e incubadas con la solución comercial de detección “Real™ EnVision™ HRP” (Agilent Technologies). Este sistema, basado en un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan moléculas de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), se conjuga con anticuerpos secundarios específicos para unirse a los anticuerpos primarios ya unidos a los antígenos diana (originados en ratón o conejo). Tras 45 minutos de incubación, las preparaciones son lavadas y se añade el sustrato DAB (Agilent Technologies). La HRP acoplada al polímero cataliza la peroxidación del cromógeno DAB, que da el color marrón antes mencionado.

La inmunotinción de las muestras se cuantificó considerando el porcentaje de área teñida y la intensidad de tinción de cada corte en 5 HPFs empleando el software basado en ImageJ “mensuration DAB” (Dr. Ángel Nistal, Universidad de Oviedo, España). Para clasificar los niveles de expresión de las dianas analizadas se empleó un sistema de puntuación en el que se asignan valores de 0-2 según la intensidad de la tinción (siendo 0 nula, 1 débil y 2 intensa) y valores de 0-3 según el % de campo teñido (0 para valores por debajo del 1%, 1 para valores de 1 a 10%, 2 del 11 al 50% y 3 para valores superiores al 50%). La puntuación obtenida tras multiplicar ambos valores definió los diferentes grupos en los que se clasificó los niveles de expresión de las dianas analizadas.

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante el software “SPSS 24” (SPSS, IBM corp.). La significancia estadística de la comparación entre los diferentes grupos experimentales se obtuvo empleando el test  $\chi^2$  (con la corrección de Yates cuando fuese apropiado). Las curvas de supervivencia se calcularon mediante la estimación del límite de producto de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se analizaron mediante el método “log-rank” y la ratio “Hazard” fue calculado con el análisis de regresión univariada de Cox. Todos los test se realizaron considerando dos colas y el umbral crítico de significancia para los p-values fueron los valores inferiores a 0,05.

## **4. Ensayos bioquímicos**

### **4.1. Análisis de proteínas**

El análisis de expresión proteica en las diferentes muestras se realizó a partir de extractos celulares de proteínas extraídas directamente de cultivo. En términos generales, los cultivos celulares destinados a la extracción de proteínas se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro para posteriormente ser lavados con PBS hasta tres veces y levantados con el uso de un raspador de células habiéndose añadido previamente 150  $\mu$ L de buffer de lisis. Dicho buffer se compone de Tris-HCl (Thermofisher Scientific) 50 mM; nonidet p40 al 1%; SDS al 0,5%, deoxidolato de sodio al 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1mM y DDT 125  $\mu$ ; estando además suplementado en fresco previo a su uso inmediato con los cócteles de inhibidores de fosfatasa 2 y 3 y el coctel de inhibidores de proteasas “Complete” mencionados en apartados anteriores. Tras el raspado de las células, las muestras fueron depositadas en hielo durante 20 minutos y centrifugadas a 13000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante con las proteínas fue entonces recogido y almacenado a -80°C.

#### **4.1.1. Cuantificación de proteínas**

La cantidad de proteína en las muestras fue cuantificada con el reactivo de Bradford (Biorad, Hercules, California, EEUU), el cual es capaz de reaccionar con los extremos “amino” terminales de las proteínas generando un viraje en el color que el propio reactivo da al medio. Para ello, se estableció una recta de calibrado con muestras de BSA a concentraciones conocidas que, tras ser diluidas 10 veces con agua destilada fueron mezcladas 1:1 con reactivo de Bradford previamente diluido en relación a 2:3 en agua destilada. A su vez, las muestras fueron diluidas 250 veces en agua destiladas y mezcladas 1:1 con el reactivo de bradford diluido. La absorbancia de las mezclas añadidas en una placa de 96 pocillos fue analizada en un lector de placas a 595 nm. Cada muestra fue analizada por triplicado.

#### **4.1.2. Western Blot**

Para el análisis de la mayor parte de las muestras de proteínas se realizaron electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa. Para ello, se prepararon geles de entre 1 o 1,5 mm de grosor compuestos de una parte analítica con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (Thermofisher Scientific) del 6 al 12%; y una región de

empaquetamiento alrededor del 4% que se polimerizó sobre un cepillo de 10 o 15 pocillos de cara a formar las regiones de carga de las muestras.

Por otro lado, se obtuvieron alícuotas de las muestras analizadas con entre 20 y 40  $\mu\text{g}$  de proteína que fueron diluidas a volúmenes semejantes en comparación a todas las muestras de un mismo gel con buffer de lisis (entre 10 y 30  $\mu\text{L}$  finales) y a los que se añadió buffer de carga “Laemmli sample buffer 6x” (VWR Chemicals) hasta quedar este diluido 6 veces. A partir de aquí los extractos fueron incubados a 95°C durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas, salvo en el caso de muestras destinadas al análisis de receptores de membrana como las bombas ABC que no fueron desnaturalizadas. De esta manera, los extractos fueron cargados en los pocillos del gel de carga, dejando uno libre para cargar el de 4 a 10  $\mu\text{L}$  (según el tamaño del pocillo) del marcador de peso molecular preteñido “Precision Plus Protein™ Dual Color Estándards” (Biorad). La electroforesis se realizó usando el sistema Miniprotean III (Biorad) empleando como buffer de electroforesis “Tris-Glicina” conformado por Tris-base (Thermofisher Scientific) 48 mM y glicina (Thermofisher Scientific) 39 mM en agua destilada. Este proceso se llevó a cabo aplicando sobre los geles un voltaje inicial entre 70-75 V durante unos 15 minutos de cara a favorecer el empaquetamiento de las muestras; para luego ser elevado a 100 V durante el tiempo necesario para que situar la región donde se espera encontrar las dianas en la zona central del gel analítico.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles con las muestras ordenadas en el proceso fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Este proceso se llevó a cabo mediante un sistema de transferencia húmeda “Mini-Trans Blot (Biorad) en el que se empleó o bien buffer “Tris-Glicina” o buffer CAPS, compuesto por CAPS (Sigma Aldrich) 100 mM y NaOH 40 mM con metanol al 20%. Las membranas de nitrocelulosa empleadas en este proceso fueron membranas “Amershan Protan” de 0,45 micras de grosor (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU). La transferencia se llevó a cabo con una intensidad de corriente estable de 100 V durante 2 horas en el caso de la “Tris-Glicina”, recubriendo el sistema con hielo; o a 25 mA por gel durante 2 horas y media con el buffer CAPS. Alternativamente, también se realizaron transferencias haciendo uso del kit de transferencia “Trans-Blot Turbo RTA mini 0,2  $\mu\text{m}$  Nitrocellulose Transfer Kit” (Biorad), que permite la transferencia semihúmeda rápida en membranas de 0,2 micras haciendo uso del equipo de transferencia “Trans-Blot® Turbo™ Transfer System” (Biorad) siguiendo las directrices del fabricante.

Para verificar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas fueron teñidas con una solución de rojo Ponceau al 0,5% en ácido acético al 5%, siendo lavadas varias veces con agua destilada para retirar el colorante de las regiones sin proteína. Tras comprobar el estado de las membranas, estas fueron lavadas hasta la completa eliminación del tinte con buffer de lavado TBS con tween 20 al 0,1% (TBS-T), el cual se compone de 2,4 g/L de Tris; 8,8 g/L de NaCl y se lleva con HCl a un pH DE 7,6.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas para limitar la aparición de interacciones inespecíficas con los anticuerpos con BSA al 5% en TBS-T. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiental o toda la noche a 4°C en agitación; con una solución de BSA al 3% en TBS-T, conteniendo los anticuerpos primarios contra las dianas de interés. Además, las diluciones de anticuerpos generadas pudieron, en muchos casos, ser almacenadas a 4°C con acida sódica 1 mg/mL para su reutilización. Los anticuerpos empleados en esta etapa se detallan en la **Tabla 8**. Tras esta primera incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T para posteriormente incubarlos durante 1 hora en condiciones ambientales en una dilución en BSA al 3% en TBS-T con los anticuerpos secundarios contra ratón o conejo, según el animal en el que se generó el anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios están unidos a los marcadores de fluorescencia infrarroja “IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L)” (ref 926-32211, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EEUU) para anticuerpos de conejo y “IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG (H+L) (ref 926-68070, Li-Cor Bioscience), para ratón. Finalmente, las membranas fueron lavadas en TBS-T durante 20 minutos y reveladas en un escáner “Odyssey FC” (Li-Cor Bioscience) a 700 u 800 nm según el anticuerpo secundario. Además, los resultados fueron analizados en el software asociado a este escáner “Image Studio” (Li-Cor Bioscience), que permitió la cuantificación de los niveles de expresión en cada caso.



**Tabla 8:** Lista de anticuerpos empleados para los ensayos de detección de proteínas incluidos en este compendio

<b>Diana</b>	<b>Dilución</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Aplicación</b>
<b>SP1</b>	1:1000	Conejo	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, EEUU)	9389	Western Blot
<b>Survivina</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	2808	Western Blot
<b>CHK2</b>	1:200	Ratón	Cell Signalling	2662	Western Blot
<b>Fosfo-CHK2 (T68)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	2197	Western Blot
<b>AKT</b>	1:1000	Ratón	Cell Signalling	4691	Western Blot
<b>Fosfo-AKT (S473)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	4060	Western Blot
<b>4EBP1</b>	1:1000	Ratón	Cell Signalling	9644	Western Blot
<b>Fosfo-4EBP1 (S65)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	9451	Western Blot
<b>S6</b>	1:1000	Ratón	Cell Signalling	2317	Western Blot
<b>Fosfo-S6 (S235/236)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	4858	Western Blot Inmunohistoquímica
<b>Fosfo-STAT3 (T705)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	9142	Western Blot
<b>ABCB1</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	13342	Western Blot
<b>MAML1 (D3K7B)</b>	1:1000	Conejo	Cell Signalling	12166	Western Blot
<b>IGF1R</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EEUU)	sc-814649	Western Blot
<b>cMYC</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-40	Western Blot
<b>VEGF</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-57496	Western Blot
<b>BCL2</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-783	Western Blot
<b>NOTCH1 (A-8)</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-376403	Western Blot
<b>HES1 (E-5)</b>	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-166410	Western Blot
<b>ABCG2</b>	1:1000	Conejo	AbCam (Cambridge, Reino Unido)	ab108312	Western Blot
<b>PARP-escindido</b>	1:1000	Conejo	AbCam	ab32064	Western Blot
<b>NOTCH1 procesado</b>	1:1000	Conejo	AbCam	ab52627	Western Blot Inmunohistoquímica
<b>B-Actina</b>	1:10000	Ratón	Sigma Aldrich	A5441	Western Blot
<b>YH2AX (S139)</b>	1:500	Ratón	Merck Millipore	05-636	Inmunofluorescencia
<b>NOTCH1 (D1E11) XP®</b>	1:400	Ratón	Cell signalling	3608	Inmunofluorescencia

### **4.1.3. Matriz de anticuerpos**

El estado de fosforilación de un amplio rango de RTKs así como algunas dianas asociadas en extractos de proteínas de muestras tratadas con varios inhibidores multiquinasas fueron analizados en el panel de anticuerpos “PathScan RTK Signaling Antibody Array Kit” (ref 7982, Cell Signalling). Además, en lugar del buffer RIPA, la lisis celular se llevó a cabo con el reactivo contenido en este kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como en el caso anterior, la expresión de las diferentes dianas contenidas en el panel en base a la fluorescencia infrarroja fue detectada al revelarlo en el Odyssey Fc tomando medidas a 700 y 800 nm. Los niveles de expresión fueron cuantificados empleando el software “Image Studio”, de manera que fue posible obtener la señal media de cada punto de señal duplicado, habiendo previamente sustraído de cada medida la señal de fondo. A continuación, las señales obtenidas fueron normalizadas con respecto a los controles positivos del panel.

### **4.1.4. Afinidad de unión al receptor**

La afinidad de unión de diferentes inhibidores multiquinasas fue analizado en el panel de quinasas “KdELECT<sup>®</sup>” (Discover X, Fremont, California, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, se cuantificó la afinidad de unión entre el compuesto y diferentes quinasas empleando una curva de dosis-respuesta de 10 puntos, en base a los valores de las constantes termodinámicas de disociación ( $K_d$ ) obtenidas en el ensayo.

## **4.2. Análisis de expresión de ARN**

El material genómico empleado en los diversos estudios incluidos en este trabajo fue extraído a partir de pellets celulares (con más de  $10^6$  células) previamente lavados con PBS y almacenados a  $-80^\circ\text{C}$ . El ARN de las muestras fue obtenido empleando el kit “GeneMatrix Universal RNA Purification Kit” (EURX, Gdąnsk, Polonia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra de RNA quedó entonces disuelta en agua libre de RNAsas donde fue cuantificada en el sistema NanoDrop mediante la medida de la absorbancia a 260/280 nm.

### **4.2.1. RT-qPCR**

Para la cuantificación de los niveles de expresión del ARN mensajero que codifica determinadas dianas se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

por sus siglas en inglés), la cual requirió la transformación previa del ARN en cDNA mediante una PCR reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Para ello, se tomó 1 µg de ARN para realizar la reacción reversa en un termociclador con el kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR” (Thermofisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el cDNA, se prepararon 2,5 µL de muestra diluida 8 veces al que se añadieron 3,75 µL de los oligos específicos para las dianas estudiadas a una concentración 4,5 pmol; 18,75 µL de “Power SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, California EEUU), un fluoróforo que tiende a unirse al ADN de doble cadena; dNTPs con dUTPs, tampón de reacción y ADN polimerasa, y 7,5 µL de agua estéril. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Además, la expresión del ARN mensajero para la GADPH se empleó como control interno para normalizar las medidas. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) en varios pasos, uno inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, segundos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C seguidos de 50 segundos a 60°C y 50 segundos a 72°C para finalizar con una disociación a 72°C durante 10 minutos. Durante el proceso detallado, el termociclador analiza los niveles de fluorescencia emitida en cada muestra para generar un ciclo umbral (CT) a partir del cual el cDNA empieza a producirse en cantidades significativas. Posteriormente, los niveles de expresión relativos se calcularon en base a las ecuaciones:

$$EQ8: \Delta CT = CT_{muestra} - CT_{gen\ diana} - CT_{GADPH}$$

$$EQ9: \Delta\Delta CT = \Delta CT_{muestra} - CT_{calibrador}$$

$$EQ10: \text{Expresión} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Siendo el calibrador el control de la cinética, es decir, el valor con respecto al que se quiere saber si el gen diana tiene mayor o menor nivel de expresión. Además, la curva de disociación en cada muestra fue analizada para comprobar la ausencia de contaminaciones que alterasen la amplificación, debiéndose encontrar un único pico de disociación en la muestra. La diferencia estadística entre los niveles de expresión en cada caso se analizó mediante una “t de Student”. Las secuencias empleadas como patrón para la PCR se incluyen en la **Tabla 9**.

**Tabla 9:** Oligos empleados como cebadores para RT-qPCR en este trabajo

Diana	Secuencia (5' → 3')	Origen
<b>ABCB1</b>	Fw: GTGGTGGGAAC TTTGGCTG Rv: TACCTGGTCATGTCTTCCTCC	Comercial: Invitrogen, Thermofisher Scientific
<b>ABCG2</b>	Fw: ATGGATTTACGGCTTTGCAG Rv: TCTTCGCCAGTACATGTTGC	Comercial: Invitrogen, Thermofisher Scientific

#### 4.2.2. RNAseq

Con el fin de caracterizar dianas afectadas por los diferentes tratamientos en varias líneas celulares, se generaron mediante RNAseq librerías de cDNAs con el transcriptoma de dichas muestras. Para ello, se siguieron las directrices contenidas en el protocolo de librerías “NEBNEXT® Ultra Directional RNA library protocol” (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EEUU). Las librerías de cDNA fueron procesadas mediante el kit “DNA-1000 Kit” (Agilent Technologies) para el análisis de su calidad y cuantificación en el “2100 Bioanalyzer” (Agilent Technologies). Posteriormente, la secuenciación de las muestras se llevó a cabo mediante secuenciación de extremos pareados en el secuenciador “Illumina Novaseq 6000” (Illumina, San Diego, California, EEUU) realizando 150 lecturas de base. A continuación, los transcritos fueron pseudoalineados y cuantificados con el algoritmo “Salmon” empleando como genoma de referencia GRCh38. Los análisis de correlación, el estudio del componente principal y la expresión diferencial fueron realizados con el paquete DESeq2. Por otro lado, la expresión diferencial de genes fue analizada mediante el test paramétrico Wald con un ajuste Benjamini-Hochberg (padj). Aquellos genes con un  $padj < 0,01$  y un  $Log_2$  y una variación de  $\pm$  se consideraron genes significativamente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés). El paquete FGSEA fue empleado para el análisis del enriquecimiento de la selección de genes de las rutas KEGG y las regiones terminales GO (componente celular – proceso biológico – función molecular). Los grupos de datos generados durante el estudio están disponibles en el repositorio GEO-NCBI (Ref: GSE161616).

# **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

## Resultados y Discusión

### 1. Resumen de los resultados

En esta sección se introducen los resúmenes de los diferentes artículos que componen este trabajo además de información relativa a su publicación.

#### 1.1. **Artículo 1: El inhibidor multiquinasa EC-70124 incrementa sinérgicamente la actividad antitumoral de la doxorubicina en sarcomas**

En este apartado resumen el primer artículo de este compendio en el que, persiguiendo el objetivo que da nombre a este trabajo, se estudia el potencial como agente antitumoral del inhibidor multiquinasa EC70124 para el tratamiento de sarcomas. El artículo fue publicado en la revista “International Journal of Cancer”, con factor de impacto 7,36, volumen 145 primera edición, páginas 254-266, dentro de la subsección de Terapia y prevención del cáncer; DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.32081>. La versión original se adjunta en el **Anexo de artículos I** [576].

Tal y como se ha mostrado en capítulos anteriores, durante las últimas décadas las terapias establecidas para el tratamiento de sarcomas no han experimentado grandes avances en lo que respecta a neoplasias avanzadas o que hayan desarrollado metástasis. Dado que la respuesta de estos tumores a la radioterapia suele ser baja, resulta común recurrir a la quimioterapia como apoyo o alternativa a la resección quirúrgica del tumor si esta no es posible, siendo la doxorubicina el compuesto citotóxico de uso más extendido. Sin embargo, no es raro que los sarcomas acaben generando resistencia al tratamiento, la cual suele estar en parte relacionada con la expresión de bombas ABC, transportadores de membrana capaces de expulsar los compuestos citotóxicos fuera de las células neoplásicas. Es por este motivo que la búsqueda de terapias que se superpongan a los diferentes mecanismos de resistencia de estos tumores resulta trascendental. En este contexto, los inhibidores multiquinasa han demostrado tener un gran potencial contra múltiples neoplasias, siendo capaces de inhibir gran variedad de rutas oncogénicas relacionadas con la actividad quinasa, muchas de las cuales se ha reportado que juegan un papel muy relevante en sarcomas. En este primer artículo se estudia la actividad antitumoral del inhibidor multiquinasa EC-70124, un compuesto perteneciente a la familia de los indolocarbazoles generado a partir de la combinación de las rutas de biosíntesis de la estaurosporina y la rebecamicina en una cepa

de *Streptomyces albus*. A modo de modelos experimentales, se emplearon líneas celulares modelo de sarcomagénesis de liposarcoma mixoide y de sarcoma pleomórfico indiferenciado además de un panel de líneas primarias derivadas de pacientes de sarcoma.

En primer lugar, se observó que el EC-70124 muestra una capacidad antiproliferativa significativamente superior al de la midostaurina, un indolocarbazol análogo de la midostaurina cuyo uso clínico ha sido aprobado por los organismos internacionales de validación farmacológica para el tratamiento de leucemias mieloides agudas con mutaciones en FLT3. Esta diferencia está vinculada a una mayor inducción de daño a nivel genómico, bloqueo del ciclo celular en fase S y a una activación incrementada de los mecanismos de apoptosis. En contraste con lo observado en los ensayos sobre cultivos celulares, el tratamiento con EC-70124 de xenógrafos tumorales de liposarcoma mixoide solo consiguió reducir parcialmente el crecimiento tumoral.

Por otro lado, se demostró que múltiples rutas de señalización asociadas a los receptores tirosin quinasa aparecen sobreactivadas de manera recurrente en sarcomas. Entre las dianas afectadas, las más relevantes fueron aquellas moduladas por las rutas PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y SRC. Considerando las rutas de señalización mencionadas, cabe destacar que la inhibición de mTOR es un mecanismo de acción clave en la actividad antiproliferativa del EC-70124.

Además de su potencial a la hora de inhibir diferentes rutas de fosforilación, el EC-70124 es capaz de inhibir la expresión de las bombas ABC sin llegar a ser sustrato de las mismas. Partiendo de este resultado, se consideró que la desactivación de este mecanismo de resistencia podría sensibilizar a las líneas de sarcoma contra compuestos antineoplásicos de uso estandarizado como la doxorrubicina. De esta manera, se determinó que el tratamiento combinado de EC-70124 con doxorrubicina aumenta de manera sinérgica la actividad antitumoral del tratamiento tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

A modo de conclusión, el inhibidor multiquinasa EC-70124 es capaz de inhibir eficientemente varias rutas de señalización asociadas a la actividad quinasa relacionadas con el desarrollo neoplásico. Además, es capaz de desactivar los mecanismos de resistencia asociados a la expresión de las bombas ABC en sarcomas, sensibilizándolas a otros agentes antineoplásicos cuya acción está limitada por estos mecanismos. Los resultados expuestos en este trabajo denotan el gran potencial terapéutico del inhibidor multiquinasa EC-70124

para el tratamiento de sarcomas, especialmente como parte de un tratamiento combinado con otros compuestos de uso clínico generalizado.

## **1.2. Artículo 2: Nanoencapsulación de mitramicina en transfersomas y micelas poliméricas para el tratamiento de sarcomas**

La estrategia para el tratamiento de sarcomas desarrollada en este segundo artículo es la encapsulación de la MTM en nanotransportadores con el fin de mejorar la biodistribución del compuesto en el organismo de manera que se mejore la ventana terapéutica del mismo. Este artículo, cuya versión original se muestra en el **Anexo de Artículos II** ha sido publicado en la revista “Journal of Clinical Medicine”, factor de impacto 4,241, volumen 10, nº1358; dentro de la subsección “Nuevos mecanismos de patogénesis y estrategias terapéuticas para sarcomas”; DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10071358> [577].

Una buena alternativa a la búsqueda de nuevos agentes con actividad antitumoral para el tratamiento de sarcomas, contempla la recuperación de compuestos ya conocidos cuya aplicación ha quedado relegada debido a diversas limitaciones. Este es el caso de la MTM, un antibiótico natural de la familia del ácido aureólico cuya alta toxicidad ha limitado de manera significativa su uso clínico pese a demostrar un alto potencial antitumoral contra diversas neoplasias. Para hacer más viable el uso clínico de estos compuestos, una estrategia interesante es la encapsulación de los mismos en nanotransportadores con el fin de mejorar sus parámetros de biodistribución en el organismo (incrementar el tiempo de vida medio del compuesto y su acumulación en la región neoplásica) e incrementar de esta manera su ventana terapéutica.

En este trabajo se diseñaron diferentes tipos de nanotransportadores de composición inocua y biodegradable con capacidad de encapsular MTM: i) transfersomas, compuestos por lípidos, surfactantes y colesteriol y preparados por los métodos de inyección en etanol e hidratación de película fina, y ii) nanopartículas poliméricas de PLGA, preparados por evaporación del disolvente. La metodología de preparación fue optimizada de manera que los nanotransportadores diseñados presentasen unas características favorables para el transporte del compuesto en el organismo. Por un lado, se obtuvieron nanopartículas de tamaños alrededor de los 100 y los 200 nm, dimensiones que favorecen la esquivar del sistema inmune y el filtrado renal. Además, los nanovehículos de este tamaño tienden a acumularse en tejido neoplásico debido a la estructura aberrante que presentan los vasos sanguíneos



generados por la inducción hiperestimulada de la actividad angiogénica asociada a la oncogénesis. Por otro lado, las nanopartículas diseñadas mostraron una dispersidad de tamaños relativamente baja y eficacias de encapsulación adecuadas para la encapsulación de la MTM.

Una vez diseñados los nanovehículos, la actividad antineoplásica de la mitramicina libre y encapsulada contra modelos celulares de sarcomagénesis de liposarcoma mixoide y en una línea primaria derivada de paciente de condrosarcoma. La mitramicina encapsulada fue capaz de retener la potente actividad antiproliferativa y de eliminar subpoblaciones CSCs en cultivos celulares. Asimismo, el compuesto retuvo la capacidad de inhibir diversas dianas moduladas por el factor de transcripción SP1, ampliamente descrito como la principal diana inhibida por la MTM. Para finalizar, se funcionalizó la membrana de las PNP de PLGA añadiendo un marcador de fluorescencia que permitió confirmar la integración de las nanovesículas en las células expuestas al tratamiento.

A modo de conclusión, las formulaciones y métodos de preparación de los nanovehículos diseñadas en este trabajo resultaron idóneos para la obtención de características adecuadas para la mejora de la biodistribución de la MTM en el organismo. Este compuesto demostró tener un alto potencial antitumoral contra las líneas de sarcoma testadas independientemente de su encapsulación.

### **1.3. Artículo 3: Sistemas de distribución de mitramicina para el desarrollo de terapias efectivas en sarcomas**

En este apartado, se introducirá el tercer artículo de este compendio, también centrado en la encapsulación de MTM como estrategia para la mejora de la ventana terapéutica del compuesto. Este artículo, cuya versión original se encuentra en el **Anexo de Artículos III**, fue publicado en la revista “Journal of Nanobiotechnology”, factor de impacto 10,435, volumen 19, nº 267 (2021); DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01008-x> [578].

En línea con lo expuesto en el artículo anterior, la encapsulación de MTM en nanovehículos persigue mejorar los parámetros farmacocinéticos y la especificidad del tratamiento, pudiendo reducir la toxicidad sistémica asociada al mismo e incrementar su potencial antineoplásico. Esto, en última instancia, haría más viable el uso de la MTM en clínica. En este trabajo se diseñaron varios tipos de nanovehículos para la encapsulación de la MTM, se

caracterizó su perfil inhibitorio contra diversas dianas asociadas al desarrollo neoplásico en sarcomas, y se evaluó el efecto de la encapsulación del compuesto en su capacidad antitumoral tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

En este caso, los nanotransportadores diseñados fueron: i) liposomas unilamelares pequeños, preparados por el método de evaporación en fase inversa o inyección en etanol y compuestos por una combinación de diferentes tipos de fosfolípidos, ii) PNPs de PLA mediante nanoprecipitación, e iii) hidrogeles preparados mediante el uso de un hidrogelador no peptídico derivado de la urea. Como en el caso anterior, los nanovehículos diseñados mostraron características idóneas para la biodistribución del fármaco en el organismo siguiendo los mismos criterios. Además, se evaluó la cinética de liberación del compuesto observándose grandes diferencias. Mientras que las nanovesículas presentan una tasa de liberación más reducida y las PNPs intermedia, los hidrogeles apenas retienen el fármaco unas horas.

Tras la realización de ensayos funcionales sobre las líneas celulares empleadas en el estudio anterior, se demostró que la MTM encapsulada en los nanotransportadores diseñados en este trabajo también retiene su alto potencial antiproliferativo y para erradicar las subpoblaciones CSCs. Además, se comprobó una tendencia similar en la capacidad del fármaco para inhibir la invasión neoplásica. Por otro lado, los análisis transcriptómico y de expresión de proteínas moduladas por SP1 sobre muestras expuestas a MTM libre y encapsulada evidenciaron que la encapsulación del compuesto también mantiene su robusto perfil de represión génica y traduccional.

Finalmente, el tratamiento de xenógrafos tumorales con MTM libre y encapsulada en los nanoliposomas mostró que la encapsulación del agente antitumoral mejora su efectividad antitumoral y reduce la toxicidad sistémica *in vivo*.

De esta manera, las fórmulas diseñadas y estudiadas en este trabajo han demostrado tener un gran potencial de cara a su utilización para la administración de MTM contra sarcomas, objetivo en el que se profundizará en trabajos posteriores haciendo especial hincapié en los análisis sobre modelos animales y en la funcionalización de estos nanotransportadores, lo que permitiría dirigir el tratamiento de una manera más específica contra determinadas subpoblaciones neoplásicas.

#### **1.4. Artículo 4: El mitrólogo EC-8042 elimina las poblaciones CSCs en osteosarcomas mediante la inhibición de la ruta de NOTCH**

En esta última sección se estudiará el potencial del mitrólogo EC8042 para el tratamiento de osteosarcomas, poniendo un especial interés en el efecto del compuesto contra subpoblaciones CSCs y la relación existente entre este efecto y su capacidad para inhibir la ruta NOTCH1, íntimamente relacionada con fenotipos pluripotenciales. El artículo expuesto en este apartado está en fases finales de elaboración y será enviado en breve a una revista de alto impacto.

Retomando lo expuesto en las secciones anteriores, una de los principales factores que explican el desarrollo agresivo característico de muchos sarcomas, es la presencia de subpoblaciones de CSCs, células con capacidad de autoperpetuarse encargadas de la propagación y mantenimiento tumoral. Diversos estudios han evidenciado la capacidad del EC-8042, un compuesto generado a partir de la modificación de la ruta de biosíntesis de la MTM con un mecanismo de acción similar a la misma y un perfil de toxicidad sistémica considerablemente inferior (estudiada en los **Artículos 2 y 3**), para afectar a las subpoblaciones CSCs en varias neoplasias incluyendo diferentes clases de sarcomas. El principal objetivo de este trabajo es estudiar la actividad del EC-8042 contra subpoblaciones CSCs en osteosarcomas. Las líneas celulares empleadas como modelos experimentales en este estudio fueron varias líneas inmortalizadas de osteosarcoma, líneas primarias derivadas de pacientes de osteosarcoma y modelos “célula de origen” de liposarcomas mixoides.

Con el fin de caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la actividad neoplásica del EC-8042 se realizó un estudio transcriptómico en las células de liposarcoma mixoide y en una línea de osteosarcoma tratadas por este compuesto y se compararon los perfiles de alteración génica con los de la MTM, expuestos en el **Artículo 3**. Ambos compuestos mostraron perfiles muy robustos de alteración génica y fueron capaces de alterar múltiples rutas de señalización asociadas al desarrollo neoplásico. En el caso específico del EC-8042, este compuesto mostró una mayor capacidad de alteración génica con un grado significativo de solapamiento entre líneas celulares, sugiriendo la existencia de mecanismos de acción comunes. Entre las dianas asociadas al desarrollo oncogénico en sarcomas más afectadas por el compuesto cabe destacar VEGFA, TERT, CDH4, SRC, FAK, WNT5 o

NOTCH1. Además, el EC-8042 fue capaz de inhibir de manera específica varias rutas de señalización, entre las que se incluye NOTCH1. La capacidad del compuesto de inhibir esta ruta a diferentes niveles resulta especialmente interesante considerando los severos efectos secundarios asociados a los inhibidores específicos de la ruta existentes. Como se ha descrito en capítulos anteriores, la alteración de NOTCH1 se ha vinculado con el desarrollo oncogénico y con la adquisición de un fenotipo pluriotencial en diversas neoplasias entre las que se incluyen los osteosarcomas. En esta línea, el análisis histológico de un panel de muestras derivadas de pacientes de sarcoma evidenció la existencia de una correlación positiva entre la expresión nuclear de NOTCH1 y la agresividad tumoral, así como una esperanza de vida del paciente inferior.

Para profundizar en el papel de la inhibición de NOTCH1 en la actividad anti-CSCs del EC-8042, se generaron líneas de osteosarcoma con la expresión alterada de la ruta: i) sobreexpresión de el dominio intracelular activo de NOTCH1 (NICD) y ii) La expresión silenciada de HES1, uno de los principales efectores últimos de la ruta. Se demostró que la sobreexpresión de la ruta hace más resistentes a las subpoblaciones CSCs frente al tratamiento con EC-8042 en comparación con las parentales, resultado que se confirmó en tratamiento sobre xenógrafos tumorales en modelos animales donde los tumores generados por estas construcciones celulares fueron más resistentes al compuesto. Por otro lado, el silenciamiento de HES1 provocó una disminución de la proporción de células con características asociables a CSCs, lo cual se tradujo en una capacidad de crecimiento tumoral en xenógrafos significativamente reducida.

En términos generales, estos resultados confirman que la inhibición de NOTCH1 es un mecanismo de acción clave en la actividad del EC-8042 contra CSCs en osteosarcomas, posicionándolo como una opción terapéutica de especial interés para el tratamiento de tumores cuya expresión de NOTCH1 aparezca alterada.

## **2. Compendio de artículos**

En este apartado se expondrán adaptaciones de los artículos que comprenden esta tesis doctoral, clasificados según el objetivo general en el que se enmarcan. La versión original de los artículos publicados se encuentra en los **Anexos de artículos I, II y III**

### **2.1. Objetivo 1: Estudio del potencial antitumoral del inhibidor multiquinasa de la familia de los indocarbazoles EC-70124 para el tratamiento de sarcomas**

i) Identificación de las rutas asociadas a las RTKs vinculadas al desarrollo neoplásico más recurrentes en sarcomas; ii) Evaluación del potencial antitumoral del inhibidor multiquinasa EC-70124 contra sarcomas en comparación con la midostaurina; iii) Caracterización de los mecanismos de acción que explican la actividad antiproliferativa del EC-70124; iv) Evaluación del potencial antineoplásico de una terapia combinada entre EC-70124 y la doxorrubicina.

**2.1.1. Artículo I:** The multi-kinase inhibitor EC-70124 synergistically increase the anti-tumor activity of doxorubicin in sarcomas

**THE MULTI-KINASE INHIBITOR EC-70124 SYNERGISTICALLY INCREASED THE ANTI-TUMOR ACTIVITY OF DOXORUBICIN IN SARCOMAS**

Oscar Estupiñan<sup>1,2,3</sup>, Laura Santos<sup>1</sup>, Aida Rodriguez<sup>1</sup>, Lucía Fernandez-Nevado<sup>1</sup>, Paula Costales<sup>4</sup>, Jhudit Perez-Escuredo<sup>4</sup>, Maria Ana Herмосilla<sup>4</sup>, Patricia Oro<sup>4</sup>, Veronica Rey<sup>1,2</sup>, Juan Tornín<sup>1,2</sup>, Eva Allonca<sup>1</sup>, Maria Teresa Fernández-García<sup>5</sup>, Carlos Alvarez-Fernández<sup>6</sup>, Alejandro Braña<sup>7</sup>, Aurora Astudillo<sup>8</sup>, Sofia T Menendez<sup>1,2,3</sup> Francisco Morís<sup>4</sup> and Rene Rodriguez<sup>1, 2,3 \*</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Central de Asturias - Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>3</sup>CIBER en oncología (CIBERONC), Madrid, Spain. <sup>4</sup>EntreChem SL, Oviedo, Spain. <sup>5</sup>Unidad Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer, IUOPA, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain. <sup>6</sup>Servicio de Oncología Médica, <sup>7</sup>Servicio de Traumatología and <sup>8</sup>Servicio de Anatomía Patológica of the Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

**ABSTRACT**

Cytotoxic drugs like doxorubicin remain as the most utilized agents in sarcoma treatment. However, advanced sarcomas are often resistant, thus stressing the need for new therapies aimed to overcome this resistance. Multi-kinase inhibitors provide an efficient way to target several pro-tumorigenic pathways using a single agent and may constitute a valuable strategy in the treatment of sarcomas, which frequently show an aberrant activation of pro-tumoral kinases. Therefore, we studied the antitumor activity of EC-70124, an indolocarbazole analog that have demonstrated a robust ability to inhibit a wide range of pro-survival kinases. Evaluation of the phospho-kinase profile in cell-of-origin sarcoma models and/or sarcoma primary cell lines evidenced that PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT or SRC were among the most highly activated pathways. In striking contrast with the structurally related drug midostaurin, EC-70124 efficiently prevented the phosphorylation of these targets and robustly inhibited proliferation through a mechanism associated to the induction of DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis. In addition, EC-70124 was able to partially reduce tumor growth *in vivo*. Importantly, this compound inhibited the expression and activity of ABC efflux pumps involved in drug resistance. In line with this ability, we found that the

combined treatment of EC-70124 with doxorubicin resulted in a synergistic cytotoxic effect *in vitro* and an increased anti-tumor activity of this cytotoxic drug *in vivo*. Altogether, these results uncover the capability of the novel multikinase inhibitor EC-70124 to counteract drug resistance in sarcoma and highlight its therapeutic potential when combined with current treatments.

**Keywords:** EC-70124, indolocarbazole, sarcoma, myxoid liposarcoma, doxorubicin, mTOR, ABC pumps, drug resistance

**Abbreviations:** MSC: mesenchymal stromal/stem cells; BMSC: bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cell; ABC: ATP binding cassette; PI3K: phosphatidylinositol-3' kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; MRCLS: myxoid/round cell liposarcoma; FUS: fused in sarcoma; CHOP: C/EBP homologous protein; S6: ribosomal protein S6 ; 4EBP1: eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1; RTK: receptor tyrosine kinase; IGF1R: insulin-like growth factor I receptor; PDGFR: platelet-derived growth factor receptor; FGFR: fibroblast growth factor receptor; AML: acute myeloid leukemia; H&E: hematoxylin and eosin; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; FNCLCC: French Federation of Comprehensive Cancer Centers; CI: combination index; CSC: cancer stem cell.

**Conflict of interest:** P.C., J.P-E., M-A.H, P.O and F.M are employees of EntreChem SL. F.M reports ownership of stock in EntreChem SL. All other authors declare they have no competing interests.

**Grant sponsor:** Agencia Estatal de Investigación (Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)); **Grant numbers:** RTC2016-4603-1, SAF-2016-75286-R. **Grant sponsor:** Center for biomedical research network, CIBERONC; **Grant number:** CB16/12/00390. **Grant sponsor:** Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología; **Grant number:** GRUPIN14-003; **Grant sponsor:** Instituto de Salud Carlos III/FEDER (Miguel Servet and Sara Borrell programs); **Grant numbers:** CPIII6/00049, CD16/00103.

**DOI:** 10.1002/ijc.32081

**History:** Received 4 Sept 2018; Accepted 5 Dec 2018; Online 21 Dec 2018

**Correspondence to:** Rene Rodriguez, Laboratorio ORL–IUOPA, Hospital Universitario Central de Asturias - Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Av. de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain, Tel.: 00-34-985107956, E-mail: renerg.finba@gmail.com or E-mail: rodriguezrene.uo@uniovi.es

**What's new?:** Wide-spectrum multi-kinase inhibitors may help forestall the onset of drug resistance in cancer. In this paper, the authors tested one such inhibitor, called EC-70124, in sarcoma cells. Sarcoma is typically treated with doxorubicin, but advanced sarcomas often develop resistance by way of ABC transporters, which pump the drug out of the cell. Here, the authors showed that EC-70124 not only slowed tumor growth *in vivo*, it inhibited the ABC pumps associated with resistance. EC-70124 also worked synergistically with doxorubicin for increased anti-tumor activity.

## INTRODUCTION

Sarcomas comprise a group of aggressive malignancies which are suggested to develop from transformed mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) [1, 2]. Despite advances in the clinical management of these diseases the overall survival for patients presenting with metastatic and recurrent disease continues to be dismal [3] and cytotoxic drugs like doxorubicin remain as the mainstay for first-line treatments [4, 5]. However, advanced sarcomas often show resistance to doxorubicin, mainly through the overexpression of members of ATP binding cassette (ABC) transmembrane family of transporters which act as efflux pumps for anti-cancer drugs [6]. Therefore, the development of therapeutic strategies able to prevent drug resistance would undoubtedly improve current sarcoma treatments [7, 8].

The phosphatidylinositol-3' kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is abnormally activated in many sarcomas and alterations in several components of this axis have been correlated with poor clinical outcome [9-12]. Specifically, myxoid and round cell liposarcomas (MRCLS), an adipocytic tumor characterized by the expression of the fusion oncogene FUS-CHOP, frequently show oncogenic events, such as mutations in *PI3KCA* or overactivation of insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) or SRC signaling, which provoke an abnormal activation of these route [13-18].

mTOR is a serine/threonine protein kinase that exists in two different complexes (mTORC1 and mTORC2). Activated mTORC1 phosphorylates its downstream targets S6 kinase-1, which in turn phosphorylates/activates the ribosomal protein S6 (S6), and the eukaryotic



initiation factor 4E-binding protein-1 (4EBP1) resulting in the activation of the synthesis of a panoply of proteins involved in cell growth, metabolism and survival [11, 19]. On the other hand, the activation of mTORC2 is involved in actin remodeling and may also contribute to complete activation of mTORC1 through the activation of AKT earlier in the pathway [9, 19]. Upstream, the PI3K/AKT/mTOR pathway may be triggered by the activation several receptor tyrosine kinases (RTKs), such as IGF1R, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) or fibroblast growth factor receptor (FGFR), and non-receptor tyrosine kinases, like SRC, whose deregulation reportedly plays a role in the tumorigenic process in several types of sarcoma [15, 17, 18, 20].

Consistent with these findings, the efficiency of several mTOR inhibitors have been evaluated in sarcomas [9]. Clinical testing of rapamycin and its derived analogs has provided at best only modest results [21]. This limited response may be explained by the fact that these compounds are efficient inhibitors of mTORC1 but not mTORC2 which contribute to induce an adaptive resistance due to the reactivation of AKT [22]. Therefore, a new generation of inhibitors able to target both complexes and/or combinatorial strategies aimed to prevent resistance to mTOR inhibitors are being tested in sarcomas [22-24].

Targeting several key oncogenic signals with a single agent may constitute an ideal alternative to increase efficiency and prevent the activation of resistance mechanisms. In line with this aim, EC-70124 is a hybrid indolocarbazole analog [25] with a potent multikinase inhibitor spectrum affecting key signaling kinases implicated in pro-survival and proliferative pathways. Thus, EC-70124 have shown antitumor activity in breast, glioblastoma, colorectal and prostate tumors as well as in acute myeloid leukemia (AML) associated to the inhibition of a wide variety of targets including components of the PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, NF $\kappa$ B or FLT3 pathways [26-30]. Interestingly, midostaurin (PKC-412), an indolocarbazole clinically approved for AML treatment, has shown anti-tumor activity in certain sarcoma subtypes [31-33].

Here, we evaluated the anti-tumor effect properties of EC-70124 and midostaurin in relevant sarcoma models and patient-derived primary cell lines. Opposite to midostaurin, EC-70124 showed strong anti-proliferative effects through a mechanism mediated by mTOR inhibition. In addition, this drug inhibited the expression and activity of ABC transporters and synergized *in vitro* and *in vivo* with doxorubicin, thus highlighting the therapeutic potential of this combination.

## MATERIALS AND METHODS

### **Cell culture, drugs and ethics statement.**

Transformed bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cell (hBMSC) lines with or without expression of FUS-CHOP were previously generated and characterized (Supplemental information Table S1 [34, 35]). Patient-derived primary cell cultures were generated as described in Supplemental Information. An overview of patient and tumor characteristics is given in Supplemental information Table S2. The identity of all cell lines has been authenticated by Short Tandem Repeats analysis during the last 3 months. All the cell lines were tested for Mycoplasma monthly using the LONZA MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (LONZA, Rockland CE) and cultured as previously described [34]. EC-70124 was synthesized by a proprietary process by EntreChem S.L. (Oviedo, Spain). PKC-412 (midostaurin) was synthesized from staurosporine (Biomar Microbial Technologies, León, Spain) and the identity of the isolated product verified by comparison to an authentic sample (HPLC, NMR). Stocks of EC-70124, midostaurin, doxorubicin (Sigma, St Louis, MO), torin, sorafenib, pazopanib, imatinib, BYL-719, BP-1-102 and ruxolitinib (Selleckchem, Houston, TX) were prepared as 10 mM solutions in sterile DMSO for *in vitro* experiments, maintained at -20 °C, and brought to the final concentration just before use. For *in vivo* experiments, doxorubicin was prepared in sterile saline solution and administrated intravenously and EC-70124 was dosed by oral gavage. Human samples and data from donors included in this study were provided by the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023) integrated in the Spanish National Biobanks Network. All experimental protocols have been performed in accordance with institutional review board guidelines and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias.

### **Tumorsphere culture**

Tumorsphere formation protocol and the analysis of the effects of drugs on tumorsphere cultures were previously described [36].

### **Cell viability assays**

The viability of all cell lines in the presence and absence of drugs was determined using the Cell Proliferation reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) as described before [37].

The concentration of half-maximal inhibition of viability ( $IC_{50}$ ) for each treatment was determined by non-linear regression using the graphPad Prism software (La Jolla, CA). The existence of synergy in drug combinations was determined by calculating the combination index (CI) as described in Supplemental information.

### **Western blotting and phospho-kinase antibody arrays**

Whole cell protein extraction and Western blotting analysis were performed as previously described [37]. Antibodies used are described in Supplemental Information.

The phosphorylation status of a wide range of RTKs and downstream signaling nodes was evaluated in EC-70124 or midostaurin-treated cells using the PathScan RTK Signaling Antibody Array Kit (# 7982, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Protein extraction after treatments, array incubation and signal development was performed using the reagents provided by the kit according to the manufacturer's instructions.

Infrared fluorescent signals in Western blotting and antibody array analysis were detected and quantified using a Odyssey Fc imaging system and the software Image Studio from LICOR (Lincoln, NE). The signal intensity of the background was subtracted from the signal of each spot, and the average of duplicate spots was determined. Next, normalized signal intensity was calculated by dividing the mean value in each spot over the mean value in the positive control.

### **Cell-cycle analysis**

Cell-cycle analysis was carried out as described previously [4].

### **Immunofluorescence staining**

In  $\gamma$ H2AX immunofluorescence experiments, fixation, staining and mounting of the samples were performed as previously reported [4]. Antibodies and experimental conditions are described in Supplemental Information.

### **RT-qPCR assays**

The expression of ABCB1 and ABCG2 was assessed by qPCR as described in Supplemental Information.

### **Transporter substrate and inhibition assays**

The assessment of the ability of EC-70124 to inhibit ACBB1/MDR1 and ABCG2/BCRP1 or to be a substrate for these transporters were performed by Absorption Systems (Exton, PA) as described in Supplemental Information.

### ***In vivo* tumor growth**

All experimental protocols were carried out in accordance with the institutional guidelines of the University of Oviedo and were approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Oviedo prior to the study. Female NOD/SCID mice of 6 weeks old (Janvier Labs, St Berthevin, France) were inoculated subcutaneously (s.c.) with  $2 \times 10^6$  T5H-FC#1 cells. Once tumors reached 200-300 mm<sup>3</sup>, the mice were randomly assigned to receive vehicle, EC-70124 (80 mg/Kg, q2dx11, orally), doxorubicin (4 mg/Kg, q4dx3, intra-venous) or the combination of EC-70124 (40 mg/Kg, q2dx8, orally) and doxorubicin (4 mg/Kg, q4dx3, intravenous), intra-venous. Animals were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation when tumors of the control series reached approximately 1000 mm<sup>3</sup> or if severe weight loss were observed. Mean tumor volume differences between groups were determined using a caliper (Supplemental Information). The student *t* test was performed to determine the statistical significance between different groups. The F-test was used to compare tumor volume growth kinetics. Drug efficacy was expressed as the percentage tumor growth inhibition (%TGI) (Supplemental Information). For pharmacodynamic studies, a single dose of each treatment was inoculated into immunodeficient mice carrying tumors of approximately 400-500 mm<sup>3</sup>. Tumors (n=2/3 per group) were collected after 4, 24 or 48 hours, minced, washed with PBS and homogenized in ice-cold lysis buffer (1mL/100 mg of tumor; see Supplemental Information for buffer composition) using a GentleMACS Dissociator system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to manufacturer instructions. This homogenate was centrifuged at 10,000 xg for 20 minutes at 4°C, and the supernatants containing protein extracts were transferred to new tubes and used in Western blotting experiments.

### **Histological analysis.**

Tumor samples were fixed in formol, embedded in paraffin, cut into 4-μm sections, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Tumor sections were also subjected to immunohistochemistry as previously reported [38] using the antibodies and quantification methods described in Supplemental Information. Tumor grade was analyzed in H&E stained

preparations using the French Federation of Comprehensive Cancer Centers (FNCLCC) grading system (Supplemental Information).

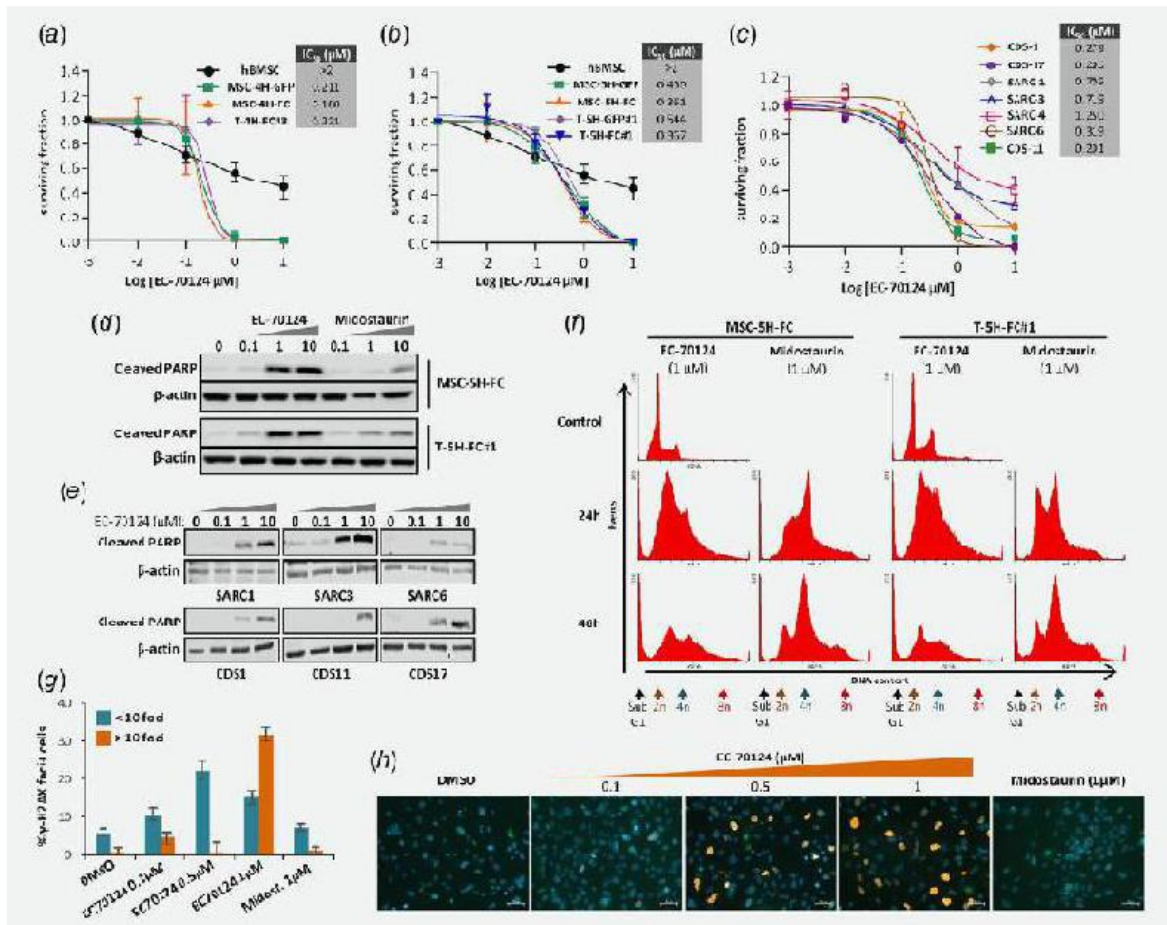
## RESULTS

### **Differential effects of the indolocarbazole analogs EC-70124 and midostaurin in sarcoma.**

To study the anti-tumor effects of indolocarbazole analogs in sarcoma we used previously developed cell-of-origin models of undifferentiated pleomorphic sarcoma (MSC-4H-GFP, MSC-5H-GFP and T-5H-GFP#1) and FUS-CHOP (FC)-expressing MRCLS (MSC-4H-FC, MSC-5H-FC, T-4H-FC#3 and T-5H-FC#1) in which hBMSCs were sequentially mutated with up to six oncogenic events (see Supplemental information Table). The evaluation of cell toxicity in dose-response experiments showed that, opposite to wild type hBMSCs, all sarcoma models were sensitive to nanomolar concentrations of EC-70124 (IC<sub>50</sub> values between 180 and 540 nM) (**Figure 1A-B**).

To further characterize the cytotoxic effect of EC-70124 we performed similar dose-response experiments in a panel of primary sarcoma cell lines (described in Supplemental information **Table S2**). A subgroup of 5 primary cell lines (CDS1, CDS17, SARC6 and CDS11) show a sensitivity to EC-70124 similar to that observed for the sarcoma models (IC<sub>50</sub> values between 201 and 343 nM), while another 3 cell lines (SARC1, SARC3 and SARC4) were more resistant (IC<sub>50</sub> values between 705 nM and 1.3  $\mu$ M) (**Figure 1C**). In accordance with this cytotoxic effect, EC-70124 treatment induced a dose-dependent apoptotic cleavage of PARP both in sarcoma models (MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cells) (**Figure 1D**) and primary cell lines (**Figure 1E**).

In striking contrast to the effect of EC-70124, sarcoma models MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 were resistant to the treatment with the structurally related compound midostaurin (Supporting Information **Fig. S1A-B**) and this drug induced only a marginal apoptotic effect compared to that of EC-70124 (**Figure 1D**). As a control, midostaurin was efficient inhibiting proliferation of a leukemia cell line as previously shown 29 (Supporting Information **Fig. S1A**). Cell cycle analysis also showed a different response of sarcoma cells to the treatment with both indolocarbazole analogs.



**Figure 1.** Antiproliferative effects of EC-70124 and midostaurin in sarcoma. (A-C) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of wild-type hMSCs and the indicated MSC-4H, T-4H (A), MSC-5H and T-5H cells lines (B) or several patient-derived sarcoma primary lines (C) with increasing concentrations of EC-70124 for 48 hours.  $IC_{50}$  values for each cell type are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments. (D-E) Apoptotic cleavage of PARP in MSC-5H-Fc and T-5H-Fc#1 cells (D) or several primary cell lines (E) treated with the indicated concentrations of EC-70124 or midostaurin for 24 hours. The expression of  $\beta$ -actin was used as loading control in Western blotting analysis. (F) Time-course evolution of the cell cycle distribution of MSC-5H-GFP and MSC-5H-Fc cells treated with 1  $\mu$ M EC-70124 or midostaurin. Peaks of cell populations with 2n, 4n and 8n DNA content, as well as the SubG1 population, are indicated. (G-H) Analysis of  $\gamma$ H2AX foci formation after the treatment of T-5H-Fc#1 cells for 6 hours with the indicated concentrations of EC-70124 or midostaurin. (G) Quantification of  $\gamma$ H2AX foci was performed by counting more than 200 cells in each condition. The percentage of cells presenting high (>10 foci) or low level (<10 foci) of DNA damage is displayed. Error bars represent the standard deviation. (H) Representative merged images ( $\gamma$ H2AX immunodetection and DAPI staining) of immunostaining experiments showing a dose-dependent increase in  $\gamma$ H2AX foci formation following EC-70124 treatment. Scale bars= 50  $\mu$ m. A version of this panel showing separate  $\gamma$ H2AX-associated and DAPI fluorescence is displayed as Supporting Information Fig. S2.

Cell cycle profiles of MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cells treated with 1  $\mu$ M EC-70124 were characterized by a strong arrest in S-phase followed by the induction of high levels of apoptosis (Sub-G1 population). On the other hand, cells treated with 1  $\mu$ M midostaurin quickly arrest in G2/M phase and underwent endoreplication without cell division resulting in cell populations with 8n DNA content after 48 hours of treatment (**Figure 1F**). In line with the different ability to induce S-phase arrest, EC-70124, but not midostaurin, was able to efficiently induce DNA damage in T-5H-FC cells as indicated by the dose-dependent increase of intranuclear  $\gamma$ H2AX foci levels (**Figure 1G-H** and Supporting Information **Fig. S2**).

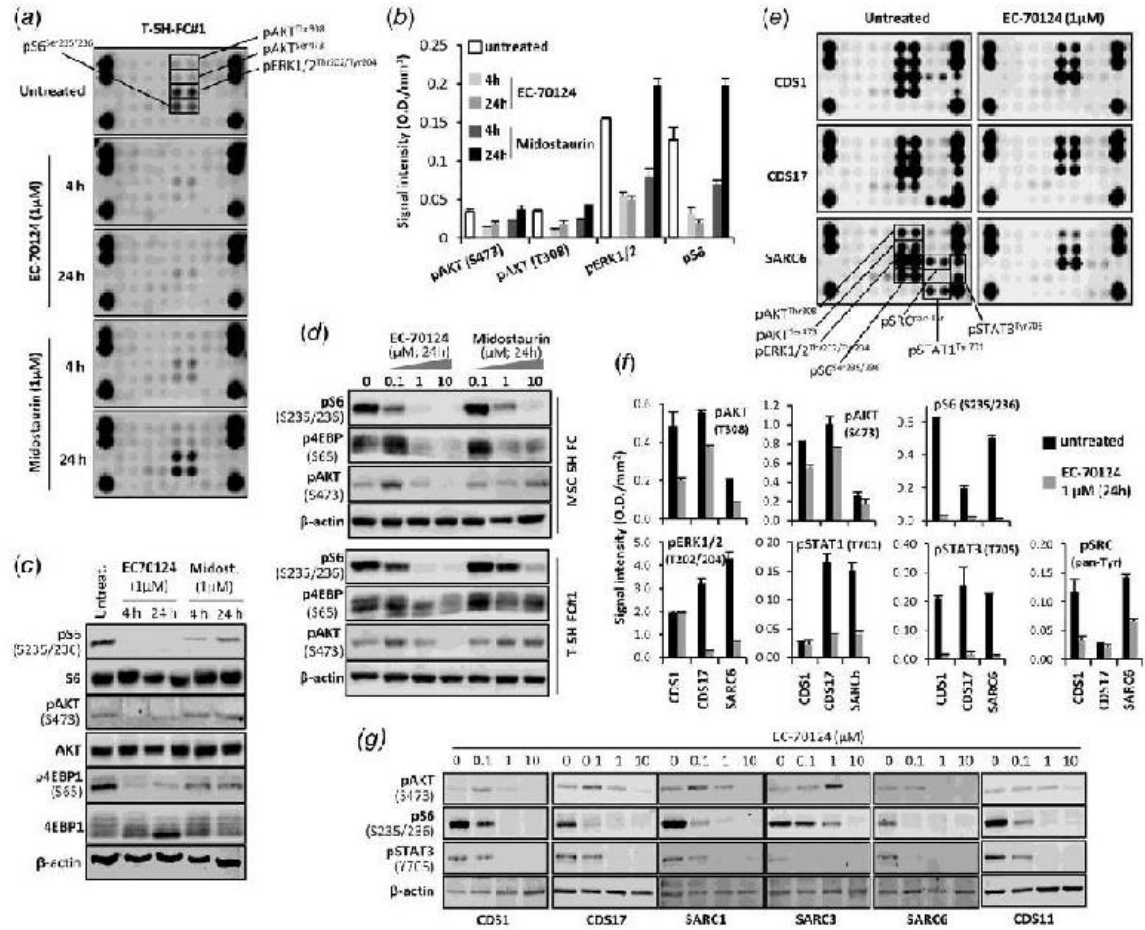
Next, we tested the ability of these indolocarbazole analogs to target cancer stem cell (CSC)-enriched tumorsphere cultures of MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cells.<sup>36</sup> Again, EC-70124 was more efficient than midostaurin in eliminating CSCs (Supporting Information **Fig. S1C**), although its cytotoxic effect on CSC subpopulations was lower than that previously observed in non-selected adherent cultures (**Figure 1A-B**) and also much lower than the effect of the mythramycin analog EC-8042, a drug with reported activity on sarcoma CSCs.<sup>37</sup>

Finally, to compare the cytotoxic effect of EC-70124 with other multikinase inhibitors already approved for cancer treatment, we treated T-5H-FC#1 cells with increasing concentrations of sorafenib, pazopanib and imatinib. All of these drugs were much more inefficient than EC-70124 in reducing cell survival, showing IC<sub>50</sub> concentrations of 20  $\mu$ M or higher (Supporting Information **Fig. S3**).

### **Effect of EC-70124 and midostaurin on the kinase profile of sarcomas**

To gain insights about the mechanistic basis of EC-70124-induced cytotoxicity in sarcomas, we used phospho-kinase antibody arrays to evaluate the ability of the indolocarbazole analogs to inhibit the phosphorylation/activation of 39 relevant receptor tyrosine kinases and signaling transducers. In T-5H-FC#1 cells, EC-70124 induced an efficient and durable inhibition of several components of the PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways, including phospho-AKT (T308 and S473), phospho-S6 (S235/236) and phospho-ERK1/2 (T202/Y204) (**Figure 2A-B**, Supporting Information **Fig. S4A** and **S5**). On the other hand, midostaurin produced a much reduced and reversible inhibition of these targets (**Figure 2A-B**). Western blotting analyses of time-course (**Figure 2C**) and dose-response experiments

(Figure 2D) confirmed that EC-70124 is much more efficient than midostaurin in inhibiting the phosphorylation of AKT and the mTOR downstream targets S6 and 4EBP1 in MRCLS models, without affecting total protein levels.



**Figure 2.** Kinase inhibitory profile of EC-70124 and midostaurin. (A & E) Phospho-kinase antibody arrays showing the phosphorylation/activation status of a panel of kinases in T-5H-FC#1 cells after the indicated treatments with EC-70124 or midostaurin (A) or in four primary sarcoma cell lines treated or not with 1  $\mu$ M EC-70124 for 24 hours (E). (B & F) Quantification of the levels of the indicated phospho-proteins in the kinase arrays loaded with T-5H-FC#1 (B) or sarcoma primary cell lines samples (F). Complete images of the phospho-kinase antibody arrays and the quantification of all analyzed kinases in T-5H-FC#1 and primary cell lines are presented as **Figures S3A&C** and **S4** respectively. (C, D & G) Western blotting analysis of the indicated indicated proteins in T-5H-FC#1 cells treated with 1 $\mu$ M EC-70124 or midostaurin for the indicated times (C), in MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cells treated with the indicated concentrations of EC-70124 for 24 hours (D) and in a panel of primary cell lines treated for 24 hours with the indicated concentrations of EC-70124 (G). Error bars in protein quantifications represent the standard deviation of two duplicates



Complementary, we calculated the inhibitor binding constants ( $K_d$  values) for a panel of kinases in the presence of several concentrations of EC-70124 or midostaurin (KdELECT assay, DiscoverX). Similar to that observed measuring phosphorylation levels, EC-70124 showed a higher potency than midostaurin to bind/inhibit mTOR signaling (S6K1, RSK2, RSK3 and RSK4) and cell cycle-related kinases (CHK1, AURKA, AURKB and AURKC) (Supplemental information Table S3).

As in T5H-FC#1 cells, AKT, S6 and ERK1/2 were the kinases/signaling molecules showing a higher level of activation/phosphorylation in three sarcoma primary cell lines. Again, EC-70124 was able to inhibit the phosphorylation of these targets, with the only exception of ERK1/2 in the line CDS1+ and AKT (S473) in the line SARC6+ (**Figure 2E-F**, Supporting Information **Fig. S4C** and **S5**). Of note, the inhibition of phospho-S6 was complete in all the assayed cell lines. In addition, some of the primary cell lines also displayed high levels of phospho-STAT1 (CDS17+ and SARC6+), phospho-STAT3 (CDS1+, CDS17+ and SARC6+) and phospho-SRC (CDS1+ and SARC6+) and EC-70124 efficiently inhibited these phosphorylations (**Figure 2E-F**). In Western blotting analysis of dose-response experiments we confirmed the ability of EC-70124 to inhibit the phosphorylation of phospho-AKT, phospho-S6 and phospho-STAT3 in six primary cell lines (**Figure 2G**).

Overall, these results indicate that EC-70124 is a more efficient multi-kinase inhibitor and show a more robust anti-proliferative effect than midostaurin in sarcomas. Also, they suggest that mTOR signaling inhibition may play a prominent role in EC-70124-induced cytotoxicity.

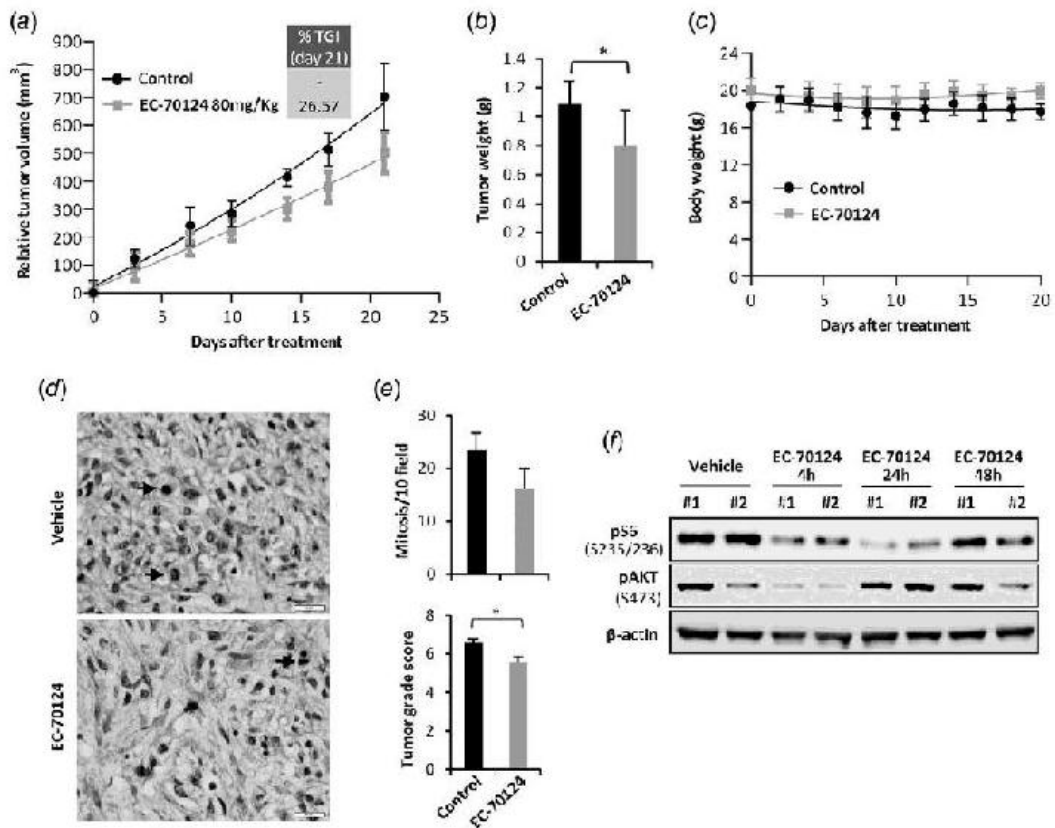
#### **mTOR signaling inhibition mediates EC-70124-induced cytotoxicity.**

To study the relevance of the contribution of mTOR signaling inhibition to the anti-tumor effects of EC-70124, we analyzed the effects of the well-known mTOR inhibitor torin in T-5H-FC#1 cells. As expected, torin was able to efficiently inhibit the phosphorylation of AKT, S6 and 4EBP1 (Supporting Information **Fig. S6A**). We found that, compared to EC-70124 and midostaurin, torin showed an intermediate capacity to reduce cell viability (Supporting Information **Fig. S6B**), and did not induce DNA damage (Supporting Information **Fig. S2**). Given that torin is a potent mTOR inhibitor, we hypothesized that if the inhibition of mTOR signaling is involved in the mediation of the cytotoxic effect of EC-70124 we do not expect a great synergy from the combination of this indolocarbazole with torin. Conversely, given

that midostaurin is a poor inhibitor of mTOR signaling, if the inhibition of mTOR signaling is a relevant mechanism we would expect a higher synergistic effect when we combine torin with midostaurin. Investigating this hypothesis, we found that combination of EC-70124 or midostaurin with increasing concentrations of torin enhanced cytotoxicity (Supporting Information **Fig. S6C-D**). However, by representing the data of these combinations normalized to the effect of torin alone, we did not find a relevant shift of toxicity curves in the combinations with EC-70124 (Supporting Information **Fig. S6E**). Otherwise, we did find an important shift toward higher toxicity in the combinations of torin with midostaurin (Supporting Information **Fig. S6F**), thus suggesting a more than additive contribution of the mTOR inhibitor to the toxicity of midostaurin. To test whether these combinations have synergistic cytotoxic effect we calculated their combination index (CI) using the CompuSyn software. In the case of combinations with EC-70124 we found an intermediate level of synergism (CI value for ED75=0.44) when we assay combinations of drugs that target between 40 and 75% of the cells ( $0.4 < Fa < 0.7$ ). However, this synergistic effect is lost at combinations of higher concentrations of drugs that affect a higher percentage of the cells ( $Fa > 0.8$ ) (Supporting Information **Fig. S6G**). This effect may be explained by the fact that at high concentrations of EC-70124 mTOR signaling is completely inhibited and a mTOR signaling inhibitor like torin cannot add a further effect. On the other hand, and in line with our rationale, the combination of increasing concentrations of torin with midostaurin resulted in a constant increase of the CI, which reached the level of strong synergism when the fraction of cells affected is higher than 70% (CI value for ED75=0.14) (Supporting Information **Fig. S6G**).

To investigate whether the inhibition of other kinases may also play a role in EC-70124 anti-tumor effect, we tested the effect of a PI3K inhibitor (BYL-719), a STAT3 inhibitor (BP-1-102) and a JAK1/2 inhibitor (ruxolitinib) alone or in combinations on T-5H-FC#1 cells. Although at higher concentrations than EC-70124 or torin, BYL-719 was able to inhibit AKT and S6 phosphorylation. In addition, BP-1-102 and ruxolitinib inhibited STAT3 phosphorylation (Supporting Information **Fig. S7A**). None of these inhibitors were efficient cytotoxic drugs, showing IC50 concentrations of 20  $\mu$ M or higher (Supporting Information **Fig. S7B-D**). Moreover, the combination of BP-1-102 with BYL-719 did not produce any increase in cytotoxicity (Supporting Information **Fig. S7E**).

Altogether, the combination of indolocarbazole analogs with torin suggested that the inhibition of the mTOR signaling plays a relevant role in anti-proliferative activity of EC-70124.



**Figure 3.** *In vivo* anti-tumor activity of EC-70124. NOD/SCID mice with established T-5H-FC#1 tumor xenografts were randomly assigned to three different groups (n=7 per group) and treated by oral gavage with either vehicle or EC-70124 at 80 mg/kg every two days. (A) Curves representing the mean tumor volume of T-5H-FC#1 xenografts during the treatments. Drug efficacy expressed as the percentage of TGI at day 21 is indicated. (B) Tumor weight at the end of the experiment. (C) Body weights of mice during the treatments. (D-E) Pathological analysis of formalin-fixed paraffin embedded xenografts extracted from mice treated as in panel A. (D) Representative images of the H&E staining of control and EC-70124-treated tumors. Mitotic cells (red arrows) are indicated. Scale bars= 50 μm. (E) Quantification of mitosis [number of mitotic Fs per 10 high power fields (40X)] and tumor grade score according to FNCLCC system in tumors from the indicated series. (F) intra-tumor phosphorylation levels (Western blotting analysis) of the key targets (G) in samples collected at the indicated time-points from mice treated with a single oral dose of 80 mg/kg EC-70124. Error bars represent the SEM and asterisks indicate statistically significant differences between EC-70124-treated and control groups (\*:p<0.05; two-sided Student t test).

### ***In vivo* anti-tumor activity of EC-70124.**

Oral treatment of NOD/SCID mice carrying T-5H-FC#1 xenografts with EC-70124 resulted in a moderate tumor growth inhibition. Compared to vehicle treated group, mice treated with 80 mg/Kg of EC-70124 every two days showed a percentage of TGI of 26.5% (**Figure 3A**).

Likewise, at the end of the experiment, tumor weights of EC-70124-treated mice were significantly lower than those of the control group (**Figure 3B**). Notably, EC-70124 treatment did not cause loss of weight (**Figure 3C**) or other adverse effects. Histological examination of tumors showed that EC-70124-treated tumors exhibited lower mitotic counts and a significant reduction in tumor grade in comparison to untreated tumor samples (**Figure 3D-E**).

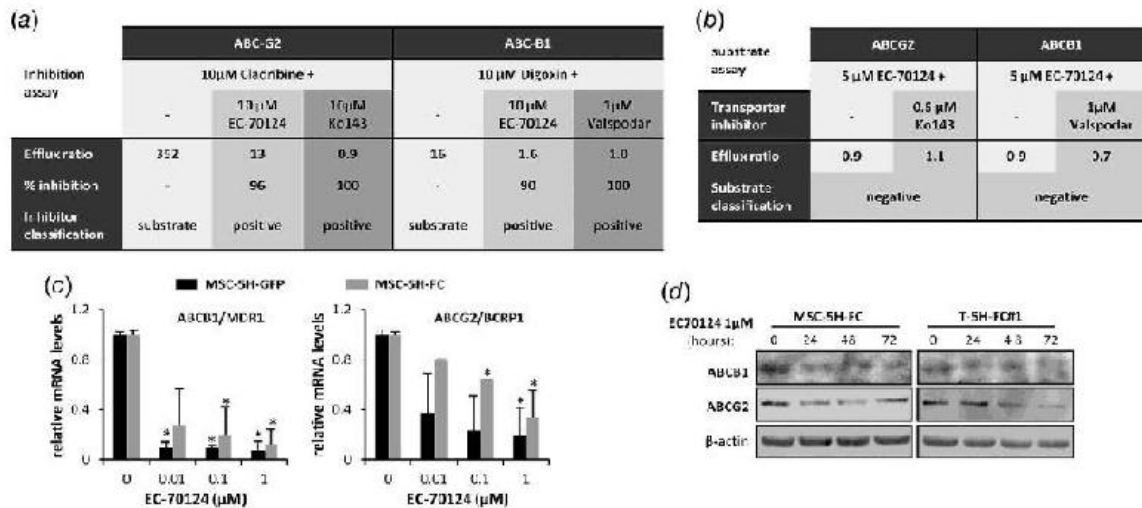
The pharmacodynamic profile of EC-70124 was obtained by analyzing protein levels in tumors collected at different time-points in a sub-cohort of mice (n=2-3) upon a single 80 mg/kg dose (**Figure 3F**). Pharmacodynamic effect of EC-70124 was in agreement with the results obtained in cultured cells. Thus, a partial inhibition of the phosphorylation of S6 and AKT was detected in tumor tissues 4 hours after the treatment, thus suggesting that same pathways identified *in vitro* are mediating the effects *in vivo* (**Figure 3F**). Recovery profile of the proteins analyzed showed that the inhibition of the phosphorylation of the mTOR target S6 was sustained for at least 24-48 hours after dosing, while phospho-AKT showed a faster recovery (**Figure 3F**).

### **EC-70124 inhibits the expression and activity of ABC transporters and is not a substrate for them.**

Several ABC transporters, such as ABCG2/BCRP1 and ABCB1/MDR1, play major roles in drug resistance in tumor cells [6-8]. It has been previously reported that a panel of indolocarbazole protein kinase inhibitors, including midostaurin, were able to inhibit the transport activity of ABCG2 [39, 40]. Therefore, we studied the interaction of EC-70124 with the two members of the ABC family most commonly involved in drug resistance of cancer cells. In functional assays we found that EC-70124 efficiently inhibited the pumping activity of both ABCG2 and ABCB1 (**Figure 4A**, Supplemental information **Table S4** and **S5**) and moreover, these pumps failed to transport this indolocarbazole analog (**Figure 4B** and Supplemental information **Table S6**). Importantly, EC-70124 was also able to decrease

the mRNA (**Figure 4C**) and protein (**Figure 4D**) expression of ABCG2 and ABCB1 in several MSC-5H and T-5H cell lines.

This inhibitory effect of EC-70124 on the expression and activity of ABC transporters suggest that, besides its anti-tumor activity, this drug may also play a role in counteracting drug resistance.

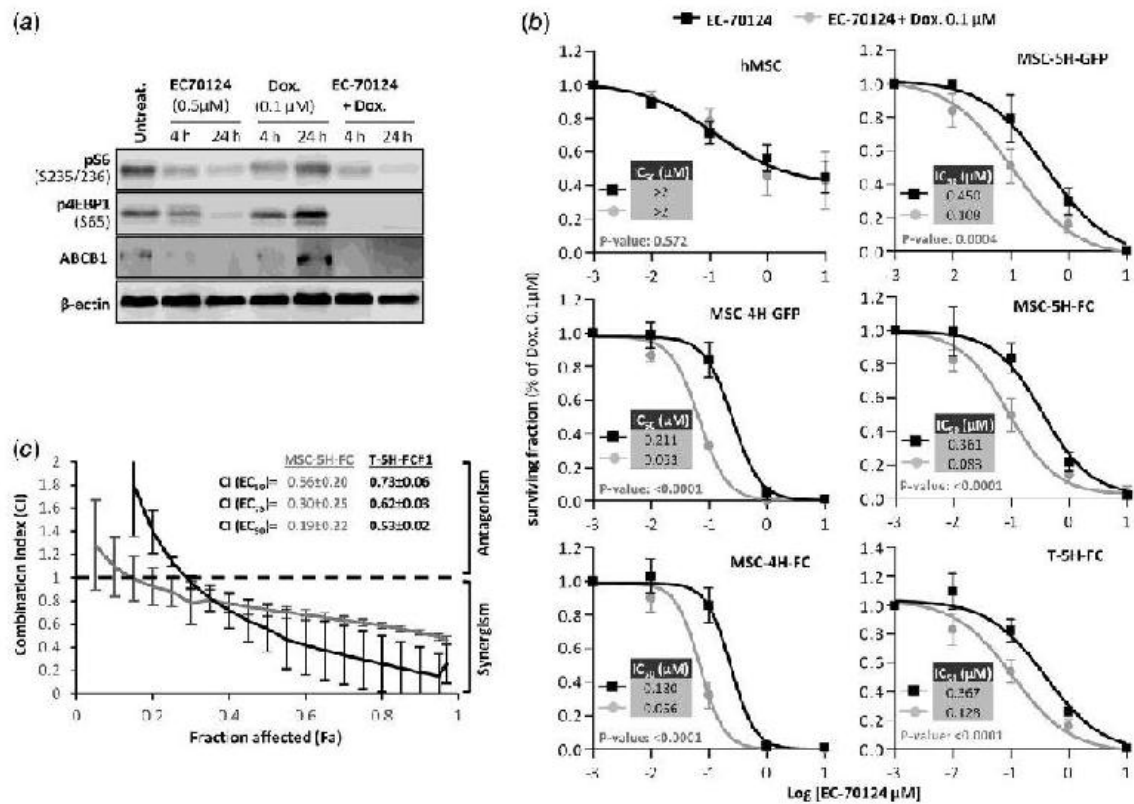


**Figure 4.** Effect of EC-70124 on ABC transporters expression and activity. (A) ABCG2 and ABCB1 functional inhibition assay for EC-70124. Cladribine and digoxin were used as known substrates and Ko243 and valsopodar were used as known inhibitors for ABCG2 and ABCB1 respectively. A complete summary of experimental results is shown in Tables S3 and S4. (B) ABCG2 and ABCB1 functional substrate assay for EC-70124. Ko243 and valsopodar were used as transporter inhibitors for ABCG2 and ABCB1 respectively. A complete summary of experimental results is shown in Supplemental information Table S5. (C) Relative mRNA expression of ABCG2 and ABCB1 genes in MSC-5H-GFP and MSC-5H-FC cells treated with the indicated concentrations of EC-70124 for 24 hours. Error bars represents the standard deviation of three independent experiments and asterisks indicate a statistically significant difference with the respective untreated samples (\*:p<0.05; two-sided Student t test). (D) Western blotting analysis of ABCG2, ABCB1 and β-actin after the indicated treatments with EC-70124.

#### **EC-70124 and doxorubicin shows synergistic cytotoxic effect *in vitro* and *in vivo*.**

Doxorubicin-based therapies are still widely used as first-line treatments of both soft tissue and bone sarcomas [5]. However, doxorubicin, like many other chemotherapeutic agents, is a well-known substrate of ABC transporters [41]. Therefore, given the ability of EC-70124 to inhibit ABC transporters, we tested whether its combination with doxorubicin may produce a synergistic anti-tumor effect. First, we found that all sarcoma models were also sensitive to nanomolar concentrations of doxorubicin (IC<sub>50</sub> values between 74 and 318 nM)

(Supporting Information **Fig. S8**). Doxorubicin treatment resulted in an up-regulation of phospho-S6, phospho-4EBP and ABCB1, while EC-70124, alone or in combination with doxorubicin efficiently decreased the levels of these targets (**Figure 5A**). Importantly, the combination of EC-70124 with 100 nM doxorubicin significantly shifted toxicity curves and markedly decreased the IC<sub>50</sub> of EC-70124 in several sarcoma model cell lines but not in wild-type hMSCs (**Figure 5B**). By calculating the CI of several constant ratio combinations of EC-70124 and doxorubicin, we confirmed the existence of synergism between both drugs in MSC-5H-FC (CI value for ED<sub>75</sub>=0.30) and T-5H-FC#1 cells (CI value for ED<sub>75</sub>=0.62) (**Figure 5C**).



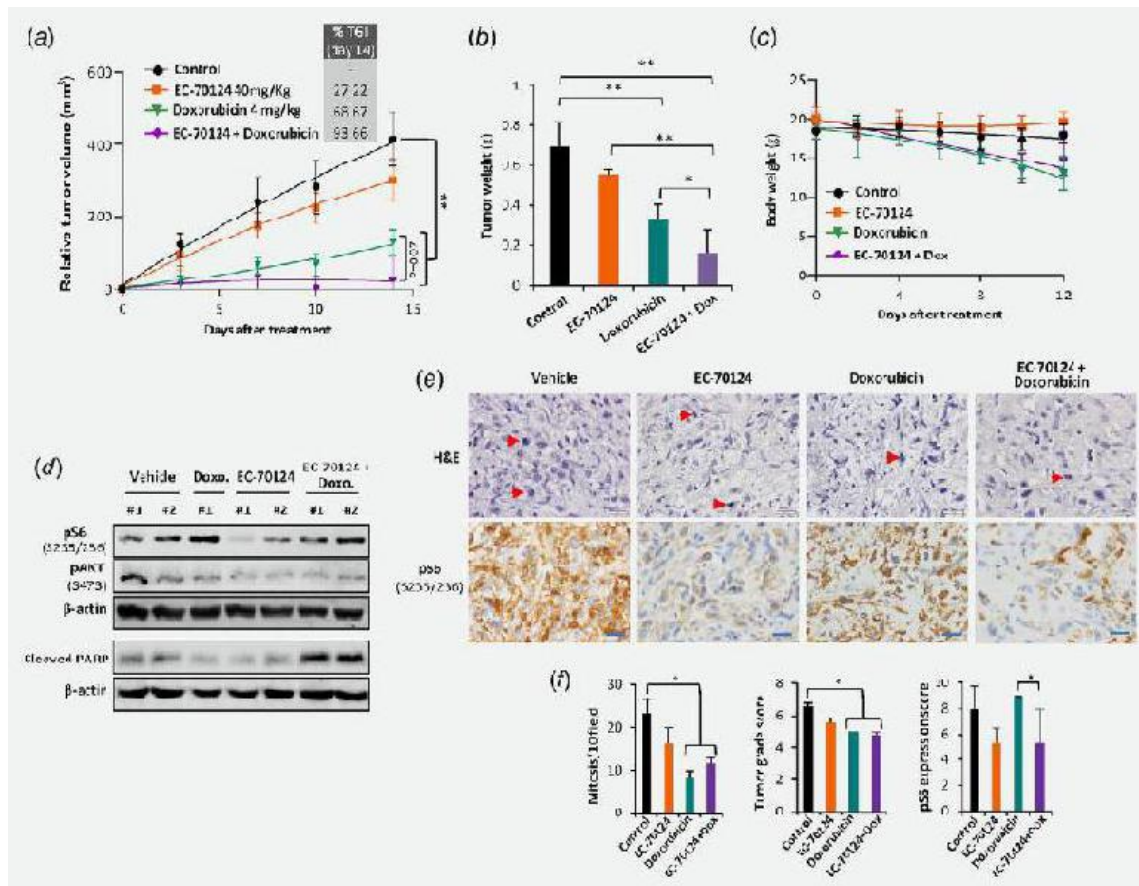
**Figure 5. EC-70124 and doxorubicin shows synergistic cytotoxic effect.** (A) Western blotting analysis of the indicated proteins after the indicated treatments with EC-70124 and/or doxorubicin. (B) Cell viability curves representing the IC<sub>50</sub> shift observed after 48 hours-treatments of the indicated cell lines with EC70124 alone or in combination with 0.1  $\mu$ M doxorubicin. Error bars represents the standard deviation of three independent experiments. (C) Combination index plots (mean and standard deviation) for constant ratio combinations of EC-70124 and doxorubicin (1:1) in MSC-5H-FC and T-5H-FC cells generated using the CompuSyn software. The CI ( $\pm$  standard deviation) values for ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> and ED<sub>90</sub> combination doses as calculated by the median effect equation are shown.

*In vivo* activity of the combination was evaluated in T-5H-FC#1 xenografts treated with oral doses of 40mg/kg EC-70124 every two days and/or intra-venous doses of 4 mg/kg doxorubicin every four days. By measuring the evolution of tumor volumes during the treatment (**Figure 6A**) and tumor weights at the end of the experiments (**Figure 6B**), we found that, as previously showed, EC-70124 caused certain level of tumor growth inhibition (% TGI= 27.2), whereas doxorubicin was more efficient in inhibiting tumor growth (% TGI = 68.7).

Importantly, the combination of EC-70124 and doxorubicin was able to reduce tumor volumes (% TGI= 93.7) in a nearly statistically significant fashion ( $P=0.09$ ) and tumor weights in a significant manner ( $P=0.01$ ) compared to the effect of both drugs alone (**Figure 6A-B**). Of note, mice treated with regimens including doxorubicin experienced important weight loss and the experiment had to be suspended on day 14 (**Figure 6C**).

Pharmacodynamic analysis showed that EC-70124 was able to inhibit the phosphorylation of S6 and AKT even in the presence of doxorubicin, which increased the phosphorylation of S6 in individual treatments (**Figure 6D**). In addition, a notably increase in apoptosis (PARP cleavage) was detected in tumors treated with the combination (**Figure 6D**). Histological examination confirmed the inhibition of phospho-S6, in tumors treated with EC-70124 alone or in combination with doxorubicin (**Figure 6E-F**). In addition, tumors treated with doxorubicin alone or in combination with EC-70124 exhibited significantly reduced mitotic counts and tumor grade (**Figure 6E-F**).

Altogether, these results indicate that the combination of EC-70124 and doxorubicin has a synergistic anti-tumor effect on sarcoma.



**Figure 6. *In vivo* effect of EC-70124 and doxorubicin combination.** T-5H-FC#1 established xenografts were randomly assigned to four different groups (n=7 per group) and treated with vehicle(s), with EC-70124 (orally) at a dose of 40 mg/kg every two days, with doxorubicin (intra-venous) at a dose of 4 mg/kg on days 0, 4 and 8, or with a combination of both drugs. (A) Curves representing the mean tumor volume of T-5H-FC#1 xenografts during the treatments. Drug efficacy expressed as the percentage of TGI at day 14 is indicated. (B) Tumor weight at the end of the experiment. (C) Body weights of mice during the treatments. (D) Intra-tumor phosphorylation levels (Western blotting analysis) of the key targets in samples collected following 0 and 4 hours of a single dose of the previously described treatments. (E-F) Pathological analysis of formalin-fixed paraffin embedded xenografts extracted from mice treated as in panel A. (E) H&E staining and immuno-staining detection of phospho-S6. mitotic cells (red arrows) are indicated. Scale bars= 50  $\mu$ m. (F) Quantification of tumor-related features including mitosis [number of mitotic figures per 10 high power fields (40X)] and tumor grade score according to FNCLCC system and levels of phospho-S6 [number of cell showing positive staining per 10 high power fields (40X)] in tumors from the indicated series. Error bars represent the SEM and asterisks indicate statistically significant differences between groups. Extra sum-of-squares F Test were used in panel A and 2wo-sided Student t test were used in panels B,D and G (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01;).



## DISCUSSION

Indolocarbazole alkaloids have attracted great attention because of their original structural features and their ability to inhibit a wide spectrum of receptor and intracellular signaling kinases [25, 42]. Among these compounds midostaurin have been recently approved for the treatment of AML patients harboring mutations in FLT3 [43]. In sarcoma, this drug has been found to inhibit the transcriptional activity of fusion oncogenes characteristic of alveolar rhabdomyosarcoma (PAX3/FKHR) and Ewing sarcoma (EWS/FLI1) as well as exhibited anti-tumor potential in these and other types of sarcomas [31-33]. In addition, midostaurin has been show to synergize with anti-tumor agents like HDAC inhibitors, oncostatin M, or IGF1R inhibitors in different types of sarcomas [44, 45].

Here we found that the indolocarbazole analog EC-70124 is much more efficient than midostaurin in inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 at Thr202 and Tyr204, AKT at Ser473 and Thr308, pS6 at Ser235 and Ser236 and 4EBP at Ser65, which are the kinases/kinase substrates more activated among a panel of relevant signaling molecules in a cell-of-origin model of MRCLS. In a similar way, EC-70124 has recently demonstrated a higher capacity than midostaurin to inhibit several clinically relevant kinases in pre-clinical models of AML [29]. In addition, EC-70124 was also able to inhibit the activation of SRC, STAT1 and STAT3 which were found activated in several primary sarcoma cell lines. This higher potential of EC-70124 as multi-kinase inhibitor in sarcomas correlated with a more potent anti-proliferative effect in comparison with midostaurin and the basis of this enhanced toxicity relies on the induction of much higher levels of DNA damage followed by a more stringent S-phase arrest and apoptosis. It has been reported that midostaurin and other indolocarbazoles inhibit Aurora kinase, resulting in abrogation of the mitotic spindle checkpoint and the accumulation of cells with 4N and 8N DNA content [46-47]. Here we observed a similar effect after the treatment of sarcoma cells with midostaurin, although this endoreplication effect is not sufficient to efficiently reduce cell viability. *In vitro* kinase binding affinity assays showed that EC-70124 inhibited Aurora kinases even more potently than midostaurin (Supplemental information Table S3) and opposite to this drug, EC-70124 was also a powerfull inhibitor of CHK1, which is a key player in the sensing and the response to DNA damage in the S and G2 phases of cell cycle [48]. This differential ability of both drugs to inhibit CHK1 may be responsible for the pronounced S-phase arrest and the

increased DNA damage and apoptosis observed after the treatment with EC-70124 but not with midostaurin.

Downstream mTORC1 effectors S6 and 4EBP were the targets whose phosphorylation levels were more consistently inhibited by EC-70124 in all the sarcomas cell lines tested. The efficient inhibition of the phosphorylation of S6 correlates with the high affinity (low Kd) of EC-70124 for S6K1 (Supplemental information Table S3). This data are in line with previously reported activity of EC-70124 in breast and colon cancer [27-30]. By combining EC-70124 or midostaurin with the mTOR inhibitor torin, we studied the role of mTOR signaling in the cytotoxic effect of indolocarbazole analogs. Torin induced certain level of toxicity and did not synergize with EC-70124, which was an efficient mTOR inhibitor by itself and therefore did not allow for a mechanistic synergy with torin. On the other hand, torin synergized with midostaurin, which was a poor and transient inhibitor of mTOR signaling. Altogether, these results suggest that, although the inhibition of other targets could contribute, the blocking of mTOR signaling plays a key role in EC-70124-induced anti-proliferative effects.

Despite the relevant role that PI3K/AKT/mTOR pathway plays in the pathogenesis of several types of sarcomas, including MRCLS [14-16], and the promising anti-tumor activity observed *in vitro*, EC-70124 showed only a small, although significant, effect *in vivo*. This effect was accompanied with a partial and durable inhibition of phospho-S6 and a transient inhibition of phospho-AKT (S473) which recovered pre-treatment levels after 24 hours. Several mechanisms of resistance involving the recovering of PI3K/AKT signaling after the activation of mTORC2 via IGFR1 or PDGFR signaling have been described for different mTOR inhibitors [20, 22, 23]. Therefore, the restoring of AKT signaling may be in the basis of the resistance to the treatment with EC-70124. Nevertheless, we have not detected an increased phosphorylation of IGF1R or PDGFR after EC-70124-treatment *in vitro* (Supporting Information Fig. S4), thus suggesting that other unknown mechanisms may be mediating the reactivation of AKT.

Signaling mediated by PI3K-AKT-mTOR has been involved in drug resistance in a wide range of tumors [9-19]. Accordingly, mTOR inhibitors were able to restore sensitivity against tyrosin kinase inhibitors and chemotherapeutic drugs like doxorubicin, cisplatin or paclitaxel in several types of tumors including sarcomas [9, 19, 49]. Apart from the anti-

apoptotic and pro-survival signals mediated by PI3K-AKT-mTOR signaling, the upregulation of members of ABC family of transporters through the activation of this pathway seems to be another important mechanism of drug resistance [19, 50]. In this regard, several Indolocarbazoles have demonstrated its ability to inhibit ABCB1 and/or ABCG2 and reverse drug resistance [39, 40]. In addition, several tyrosine kinase inhibitors have been recently reported to increase the efficacy of conventional chemotherapeutic agents through mechanisms involving the inhibition and/or the expression of different ABC pumps [8]. Here we found that EC-70124 was able to inhibit the enzymatic activity and the expression of ABCB1 and ABCG2 and moreover, it was not transported by these pumps. In line with this result, we showed that the combination of EC-70124 with doxorubicin produced a synergistic decrease of cell viability and a reduction in tumor growth *in vivo*. These findings suggest that the ability of EC-70124 to inhibit ABC transporters maybe in the basis of these enhanced anti-tumor potential of the combination.

Altogether, these results uncover the capability of the novel multikinase inhibitor EC-70124 to counteract drug resistance in sarcoma and provide a rationale for the clinical testing of the EC-70124 plus doxorubicin combination in sarcoma patients.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) [MINECO/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (RTC2016-4603-1 to EntreChem SL and SAF-2016-75286-R to R.R.), ISC III/FEDER [Miguel Servet Program (CPII16/00049 to R.R.), Sara Borrell Program (CD16/00103 to S-T.M.) and Consorcio CIBERONC (CB16/12/00390)] and the Plan de Ciencia Tecnología e Innovación del Principado de Asturias (GRUPIN14-003). We want to particularly acknowledge for its collaboration, the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023), financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Bancaria Cajastur and integrated in the Spanish National Biobanks Network.

### **AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS**

O.E., L.S., A.R., L.-FN. P.C., J.P.-E., V.R., & J.T.: development of methodology, performance of experimental procedures, acquisition, analysis and interpretation of data. M-A.H., P.O. & E.A.: performance of experimental procedures. M-T.F-G., C.A-F., A.B., A.A.

& S-T.M: analysis and interpretation of data. F.M.: provision of key materials, analysis and interpretation of data and manuscript revision. R.R: Conception and design, analysis and interpretation of data, manuscript writing and financial support. The manuscript has been seen and approved by all authors.

## REFERENCES

1. Abarrategi A, Tornin J, Martinez-Cruzado L, Hamilton A, Martinez-Campos E, Rodrigo JP, Gonzalez MV, Baldini N, Garcia-Castro J, Rodriguez R. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int* 2016; 2016:3631764.
2. Rodriguez R, Rubio R, Menendez P. Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Res* 2012; 22:62-77.
3. Chen C, Borker R, Ewing J, Tseng WY, Hackshaw MD, Saravanan S, Dhanda R, Nadler E. Epidemiology, treatment patterns, and outcomes of metastatic soft tissue sarcoma in a community-based oncology network. *Sarcoma* 2014; 2014:145764.
4. Martinez-Cruzado L, Tornin J, Rodriguez A, Santos L, Allonca E, Fernandez-Garcia MT, Astudillo A, Garcia-Pedrero JM, Rodriguez R. Trabectedin and Camptothecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models. *Neoplasia* 2017; 19:460-470.
5. Ratan R, Patel SR. Chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Cancer* 2016; 122:2952-2960.
6. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:219-234.
7. Bugde P, Biswas R, Merien F, Lu J, Liu DX, Chen M, Zhou S, Li Y. The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21:511-530.
8. Wu S, Fu L. Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer* 2018; 17:25.
9. Blay JY. Updating progress in sarcoma therapy with mTOR inhibitors. *Ann Oncol* 2011; 22:280-287.

10. Dobashi Y, Suzuki S, Sato E, Hamada Y, Yanagawa T, Ooi A. EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. *Mod Pathol* 2009; 22:1328-1340.
11. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; 168:960-976.
12. Setsu N, Kohashi K, Fushimi F, Endo M, Yamamoto H, Takahashi Y, Yamada Y, Ishii T, Yokoyama K, Iwamoto Y, Oda Y. Prognostic impact of the activation status of the Akt/mTOR pathway in synovial sarcoma. *Cancer* 2013; 119:3504-3513.
13. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, Shah K, Socci ND, Weir BA, Ho A, Chiang DY, Reva B, Mermel CH, Getz G, Antipin Y, Beroukhi R, Major JE, Hatton C, Nicoletti R, Hanna M, Sharpe T, Fennell TJ, Cibulskis K, Onofrio RC, Saito T, Shukla N, Lau C, Nelander S, Silver SJ, Sougnez C, Viale A, Winckler W, Maki RG, Garraway LA, Lash A, Greulich H, Root DE, Sellers WR, Schwartz GK, Antonescu CR, Lander ES, Varmus HE, Ladanyi M, Sander C, Meyerson M, Singer S. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet* 2010; 42:715-721.
14. Demicco EG, Torres KE, Ghadimi MP, Colombo C, Bolshakov S, Hoffman A, Peng T, Bovee JV, Wang WL, Lev D, Lazar AJ. Involvement of the PI3K/Akt pathway in myxoid/round cell liposarcoma. *Mod Pathol* 2012; 25:212-221.
15. Patel RB, Li T, Liao Z, Jaldeepbhai JA, Perera H, Muthukuda SK, Dhirubhai DH, Singh V, Du X, Yang J. Recent translational research into targeted therapy for liposarcoma. *Stem Cell Investig* 2017; 4:21.
16. Sanfilippo R, Dei Tos AP, Casali PG. Myxoid liposarcoma and the mammalian target of rapamycin pathway. *Curr Opin Oncol* 2013; 25:379-383.
17. Tornin J, Hermida-Prado F, Padda RS, Gonzalez MV, Alvarez-Fernandez C, Rey V, Martinez-Cruzado L, Estupinan O, Menendez ST, Fernandez-Nevado L, Astudillo A, Rodrigo JP, Lucien F, Kim Y, Leong HS, Garcia-Pedrero JM, Rodriguez R. FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway. *Neoplasia* 2018; 20:44-56.

18. Trautmann M, Menzel J, Bertling C, Cyra M, Isfort I, Steinestel K, Elges S, Grunewald I, Altvater B, Rossig C, Frohling S, Hafner S, Simmet T, Aman P, Wardelmann E, Huss S, Hartmann W. FUS-DDIT3 Fusion Protein-Driven IGF-IR Signaling is a Therapeutic Target in Myxoid Liposarcoma. *Clin Cancer Res* 2017; 23:6227-6238.
19. Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 2008; 11:63-76.
20. Ho AL, Vasudeva SD, Lae M, Saito T, Barbashina V, Antonescu CR, Ladanyi M, Schwartz GK. PDGF receptor alpha is an alternative mediator of rapamycin-induced Akt activation: implications for combination targeted therapy of synovial sarcoma. *Cancer Res* 2012; 72:4515-4525.
21. Mita MM, Gong J, Chawla SP. Ridaforolimus in advanced or metastatic soft tissue and bone sarcomas. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013; 6:465-482.
22. Lamhamedi-Cherradi SE, Menegaz BA, Ramamoorthy V, Vishwamitra D, Wang Y, Maywald RL, Buford AS, Fokt I, Skora S, Wang J, Naing A, Lazar AJ, Rohren EM, Daw NC, Subbiah V, Benjamin RS, Ratan R, Priebe W, Mikos AG, Amin HM, Ludwig JA. IGF-1R and mTOR Blockade: Novel Resistance Mechanisms and Synergistic Drug Combinations for Ewing Sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108.
23. May CD, Landers SM, Bolshakov S, Ma X, Ingram DR, Kivlin CM, Watson KL, Sanna GAA, Bhalla AD, Wang WL, Lazar AJ, Torres KE. Co-targeting PI3K, mTOR, and IGF1R with small molecule inhibitors for treating undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Cancer Biol Ther* 2017; 18:816-826.
24. Slotkin EK, Patwardhan PP, Vasudeva SD, de Stanchina E, Tap WD, Schwartz GK. MLN0128, an ATP-competitive mTOR kinase inhibitor with potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity, as potential therapy for bone and soft-tissue sarcoma. *Mol Cancer Ther* 2015; 14:395-406.
25. Sanchez C, Salas AP, Brana AF, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbajo RJ, Mendez C, Moris F, Salas JA. Generation of potent and selective kinase inhibitors by combinatorial biosynthesis of glycosylated indolocarbazoles. *Chem Commun (Camb)* 2009:4118-4120.

26. Civenni G, Longoni N, Costales P, Dallavalle C, Garcia Inclan C, Albino D, Nunez LE, Moris F, Carbone GM, Catapano CV. EC-70124, a Novel Glycosylated Indolocarbazole Multikinase Inhibitor, Reverts Tumorigenic and Stem Cell Properties in Prostate Cancer by Inhibiting STAT3 and NF-kappaB. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:806-818.
27. Cuenca-Lopez MD, Serrano-Heras G, Montero JC, Corrales-Sanchez V, Gomez-Juarez M, Gascon-Escribano MJ, Morales JC, Voisin V, Nunez LE, Moris F, Bader GD, Pandiella A, Ocana A. Antitumor activity of the novel multi-kinase inhibitor EC-70124 in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6:27923-27937.
28. Nogueira L, Ruiz-Ontanon P, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Berciano MT, Aldaz B, Grande L, Casafont I, Segura V, Robles EF, Suarez D, Garcia LF, Martinez-Climent JA, Fernandez-Luna JL. Blockade of the NFkappaB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 2011; 30:3537-3548.
29. Puente-Moncada N, Costales P, Antolin I, Nunez LE, Oro P, Hermosilla MA, Perez-Escuredo J, Rios-Lombardia N, Sanchez-Sanchez AM, Luno E, Rodriguez C, Martin V, Moris F. Inhibition of Flt3 and Pim Kinases by Ec-70124 Exerts Potent Activity in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Ther* 2018.
30. Serrano-Heras G, Cuenca-Lopez MD, Montero JC, Corrales-Sanchez V, Morales JC, Nunez LE, Moris F, Pandiella A, Ocana A. Phospho-kinase profile of colorectal tumors guides in the selection of multi-kinase inhibitors. *Oncotarget* 2015; 6:31272-31283.
31. Amstutz R, Wachtel M, Troxler H, Kleinert P, Ebauer M, Haneke T, Oehler-Janne C, Fabbro D, Niggli FK, Schafer BW. Phosphorylation regulates transcriptional activity of PAX3/FKHR and reveals novel therapeutic possibilities. *Cancer Res* 2008; 68:3767-3776.
32. Boro A, Pretre K, Rechfeld F, Thalhammer V, Oesch S, Wachtel M, Schafer BW, Niggli FK. Small-molecule screen identifies modulators of EWS/FLI1 target gene expression and cell survival in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2012; 131:2153-2164.

33. Kawamoto T, Akisue T, Kishimoto K, Hara H, Imabori M, Fujimoto T, Kurosaka M, Hitora T, Kawaguchi Y, Yamamoto T. Inhibition of PKC $\alpha$  activation in human bone and soft tissue sarcoma cells by the selective PKC inhibitor PKC412. *Anticancer Res* 2008; 28:825-832.
34. Rodriguez R, Rosu-Myles M, Arauzo-Bravo M, Horrillo A, Pan Q, Gonzalez-Rey E, Delgado M, Menendez P. Human bone marrow stromal cells lose immunosuppressive and anti-inflammatory properties upon oncogenic transformation. *Stem Cell Reports* 2014; 3:606-619.
35. Rodriguez R, Tornin J, Suarez C, Astudillo A, Rubio R, Yauk C, Williams A, Rosu-Myles M, Funes JM, Boshoff C, Menendez P. Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem Cells* 2013; 31:2061-2072.
36. Martinez-Cruzado L, Tornin J, Santos L, Rodriguez A, Garcia-Castro J, Moris F, Rodriguez R. Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations. *Sci Rep* 2016; 6:27878.
37. Tornin J, Martinez-Cruzado L, Santos L, Rodriguez A, Nunez LE, Oro P, Hermosilla MA, Allonca E, Fernandez-Garcia MT, Astudillo A, Suarez C, Moris F, Rodriguez R. Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma. *Oncotarget* 2016; 7:30935-30950.
38. Rubio R, Abarrategi A, Garcia-Castro J, Martinez-Cruzado L, Suarez C, Tornin J, Santos L, Astudillo A, Colmenero I, Mulero F, Rosu-Myles M, Menendez P, Rodriguez R. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014; 32:1136-1148.
39. Robey RW, Shukla S, Steadman K, Obrzut T, Finley EM, Ambudkar SV, Bates SE. Inhibition of ABCG2-mediated transport by protein kinase inhibitors with a bisindolylmaleimide or indolocarbazole structure. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:1877-1885.
40. Utz I, Hofer S, Regenass U, Hilbe W, Thaler J, Grunicke H, Hofmann J. The protein kinase C inhibitor CGP 41251, a staurosporine derivative with antitumor activity, reverses multidrug resistance. *Int J Cancer* 1994; 57:104-110.



41. Wu D, Liu L, Yan X, Wang C, Wang Y, Han K, Lin S, Gan Z, Min D. Pleiotrophin promotes chemoresistance to doxorubicin in osteosarcoma by upregulating P-glycoprotein. *Oncotarget* 2017; 8:63857-63870.
42. Gallogly MM, Lazarus HM. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J Blood Med* 2016; 7:73-83.
43. Manley PW, Weisberg E, Sattler M, Griffin JD. Midostaurin, a Natural Product-Derived Kinase Inhibitor Recently Approved for the Treatment of Hematological Malignancies. Published as part of the Biochemistry series "Biochemistry to Bedside". *Biochemistry* 2018; 57:477-478.
44. Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Richards CD, Heymann D, Redini F, Blanchard F. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5400-5409.
45. Radic-Sarikas B, Tsafou KP, Emdal KB, Papamarkou T, Huber KV, Mutz C, Toretsky JA, Bennett KL, Olsen JV, Brunak S, Kovar H, Superti-Furga G. Combinatorial Drug Screening Identifies Ewing Sarcoma-specific Sensitivities. *Mol Cancer Ther* 2017; 16:88-101.
46. Kawai M, Nakashima A, Kamada S, Kikkawa U. Midostaurin preferentially attenuates proliferation of triple-negative breast cancer cell lines through inhibition of Aurora kinase family. *J Biomed Sci* 2015; 22:48.
47. Stolz A, Vogel C, Schneider V, Ertych N, Kienitz A, Yu H, Bastians H. Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69:3874-3883.
48. Rodriguez R, Gagou ME, Meuth M. Apoptosis induced by replication inhibitors in Chk1-depleted cells is dependent upon the helicase cofactor Cdc45. *Cell Death Differ* 2008; 15:889-898.
49. Squillace RM, Miller D, Cookson M, Wardwell SD, Moran L, Clapham D, Wang F, Clackson T, Rivera VM. Antitumor activity of ridaforolimus and potential cell-cycle

determinants of sensitivity in sarcoma and endometrial cancer models. *Mol Cancer Ther* 2011; 10:1959-1968.

50. Lee JT, Jr., Steelman LS, McCubrey JA. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64:8397-8404.

## **SUPPLEMENTAL INFORMATION**

### **MATERIALS AND METHODS**

#### **Description of transformed hBMSC sarcomas models.**

Sarcoma initiating cells have previously developed from hBMSCs sequentially mutated with up to 5 oncogenic events [1]. This collection of hBMSCs ranges from wt (MSC-0H) to fully transformed hBMSCs (MSC-5H). In addition, the fusion oncogene FUS-CHOP (FC), characteristic of myxoid liposarcoma, or the corresponding GFP-control, is ectopically expressed in all the MSC types [2]. Table S1 summarizes the main features and tumorigenic potential of the different hBMSCs used in this study. Briefly, MSC-4H-GFP cells are immortalized, but not transformed and the rest of the MSC types are transformed and originate sarcomas *in vivo*. Thus, MSC-5H-GFP give rise to pleomorphic undifferentiated sarcomas, meanwhile FUS-CHOP-expressing hBMSCs (MSC-4H-FC, and MSC-5H-FC) initiate MLS-like tumors. Several cell lines were also derived from xenograft tumors generated by transformed hMSCs (T-4H-FC#3, T5H-GFP#1 and T5H-FC#1).

#### **Establishment of primary cell cultures from surgical samples.**

Surgical samples were obtained upon informed consent from patients and processed according to the experimental protocols approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias. An overview of patient and tumor characteristics is given in table S2.

To establish primary cell lines fresh tumor samples were subjected to mechanical disaggregation followed by enzymatic treatment with 0.25 mg/ml Liberase Blendzyme (Roche) at 37°C for 15 min, agitating every 5 min. Alternatively, tumors was disaggregated using using a MACS Tissue Dissociation Kit and the GentleMACS Dissociator system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to manufacturer instructions. At the end of the incubation, culture medium (DMEM medium supplemented with 20% FBS, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) was added and the cell suspension was filtered to remove clusters. Tumor cells were collected by centrifugation, resuspended in fresh culture medium and seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks. As an alternative protocol to derived cell lines, some fresh tumor specimens were cut into several small fragments, transferred to dry 25 cm<sup>2</sup> culture flasks, covered with a drop of medium and incubated until

outgrowth of tumor cells was observed. Cell cultures derived by both methods were subcultured when they reached 80-90% confluence. As a procedure to select tumoral cells and rid of stromal cells, we performed soft agar colony formation assays using the CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay Kit (Cell Biolabs Inc, San Francisco, CA). Cells able to form colonies under these anchorage-independent growth conditions are supposed to be transformed. These colonies were recovered, left to attach to plastic substrate and growth in culture medium as normal adherent cultures. These cell lines were used at passages between 2 and 8 after purification from soft agar colony formation assays.

### **Analysis of synergism in drug combinations**

The existence of synergy in drug combinations was determined by calculating the combination index (CI) according to the Chou and Talalay method using CompuSyn software (ComboSyn) [3]. CI vs the fraction affected (Fa) plots were generated for 6-7 combinations of drugs at a fixed ratio according to their IC<sub>50</sub>s. CI values indicate synergistic (<1), additive (=1) and antagonistic (>1) drug interactions.

### **Western blot and immunohistochemistry antibodies**

The antibodies used in Western blot analysis were as follows: anti-phospho-AKT (S473) [(4060) 1:1000 dilution], anti-AKT [(4691) 1:1000 dilution], anti-phospho-4EBP1 (S65) [(9451) 1:xxx dilution], anti-4EBP1 [(9644) 1:1000 dilution], anti-phospho-S6 (S235/236) [(4858) 1:1000 dilution], anti-S6 [(2317) 1:1000 dilution], anti-phospho-STAT3 (T705) [(9142) 1:1000 dilution] and anti-ABCB1 [(13342) 1:1000 dilution] from Cell Signaling (Danvers, MA); anti-ABCG2 [(ab108312) 1:1000 dilution] and anti-cleaved PARP [(ab32064) 1:1000 dilution] from AbCam; and anti-β-Actin [(A-1978), 1:20.000] from Sigma.

Anti-phospho-S6 (S235/236) [(4858) 1:1000 dilution] from Cell Signaling were used in immunohistochemistry analyses.

### **Quantification of immunohistochemistry staining of FFPE tumor samples**

The percentage of stained area in immunohistochemical stained samples was quantified in 5 randomly selected high power fields (40X) using the software “mensuration DAB” (Dr. Ángel Nistal, University of Oviedo, Spain; <http://www.sct.uniovi.es/confocaluniovi>) based in the Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD). A stained-area score

value from 0 to 4 was assigned to samples without staining (score 0) or with a percentage of staining between 1 and 20% (score 1), 21 and 50% (score 2), 51 and 80% (score 3) and 81 and 100% (score 4). Likewise, the intensity of staining in these areas was classified as null, weak, moderate or strong using a scoring scale from 0 to 3, respectively. Then a combined score was calculated by multiplying the stained-area and the intensity scores.

### **Immunofluorescence staining**

anti- $\gamma$ H2AX (ser139) (05-636) from Merck Millipore was used at a 1:500 dilution for 2 hours and secondary anti-mouse-alexa fluor 555 (A-21422 from Thermo Fisher) was used at a 1:300 dilution for 1 hour in dark. Section images of fluorescent samples obtained with identical exposure times were collected using a Zeiss-ApoTome Cell Observer Live Imaging microscope (Zeiss, Thornwood, NY) coupled with a Zeiss AxioCam MRc camera.

### **RT-qPCR assays**

Total RNA was extracted from wild type and transformed MSC cultures using GeneMatrix Universal RNA Purification Kit (EURX, Gdańsk, Poland). One microgram of RNA was used for each RT reaction, which was performed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher, Waltham, MA). The expression of ABCB1 and ABCG2 was assessed by qPCR using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). GAPDH was used as a housekeeping gene. The following PCR conditions were used: 5 min at 94°C, 35 cycles of 30 seconds at 94°C followed by 50 seconds at 60°C and 50 seconds at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. Primer sequences used are as follow. ABCB1: GTGGTGGGAAC TTTGGCTG [Forward (5' → 3')] and TACCTGGTCATGTCTTCCTCC [Reverse (5' → 3)]; ABCG2: ATGGATTTACGGCTTTGCAG [Forward (5' → 3')] and TCTTCGCCAGTACATGTTGC [Reverse (5' → 3')]. Statistical difference of the gene expression levels was analyzed using the Student's t test.

### **Kinase-binding assays**

The binding affinity of EC-70124 and midostaurin were determined by quantitative-binding affinity of compound–kinase interactions (KdELECT, DiscoverX, Fremont, CA) using a 10-point dose–response curve.

### **ABCB1/MDR1 and ABCG2/BCRP1 Substrate Assessment.**

Caco-2 cells (clone C2BBel) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas,VA). Cell monolayers were grown to confluence on collagen-coated, microporous, polycarbonate membranes in 12-well Costar Transwell plates. The permeability assay buffer was Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 10 mM HEPES and 15 mM glucose at a pH of 7.4. The buffer in the receiver chamber also contained 1% bovine serum albumin for test article only. The dosing solution concentration was 5  $\mu$ M of EC-70124 or 10  $\mu$ M for positive control compounds digoxin (positive control for ABCB1) and cladribine (positive control for ABCG2) in the assay buffer +/- 1  $\mu$ M Valspodar or 0.5  $\mu$ M Ko143 (inhibitor compounds for ABCB1 and ABCG2 respectively). Cells were first pre-incubated for 30 minutes with HBSS containing +/- 1  $\mu$ M Valspodar or 0.5  $\mu$ M Ko143. Cell monolayers were then dosed on the apical side (A-to-B) or basolateral side (B-to-A) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Samples were taken from the donor and receiver chambers at 120 minutes. Each determination was performed in duplicate. The flux of lucifer yellow was also measured post-experimentally for each monolayer to ensure no damage was inflicted to the cell monolayers during the flux period. All samples were assayed by LC-MS/MS using electrospray ionization.

The apparent permeability ( $P_{app}$ ) and percent recovery were calculated as follows:

$$P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_A}$$

$$Recovery \% = 100 \times \frac{V_r \times C_r^{final} + V_d \times C_d^{final}}{V_d \times C_N}$$

Where,

- $dC_r /dt$  is the slope of the cumulative concentration in the receiver compartment versus time in  $\mu$ M s<sup>-1</sup>;
- $V_r$  is the volume of the receiver compartment in cm<sup>3</sup>;
- $V_d$  is the volume of the donor compartment in cm<sup>3</sup>;
- $A$  is the area of the insert (1.13 cm<sup>2</sup> for 12-well Transwell);

- CA is the average of the nominal dosing concentration and the measured 120 minute donor concentration in  $\mu\text{M}$ ;
- CN is the nominal concentration of the dosing solution in  $\mu\text{M}$ ;
- Cr final is the cumulative receiver concentration in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period;
- Cd final is the concentration of the donor in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period.
- Efflux ratio (ER) is defined as  $P_{app}(\text{B-to-A}) / P_{app}(\text{A-to-B})$ .

A summary of experimental results is shown in Table S6.

### **ABCB1/MDR1 Inhibition Assessment**

Caco-2 cells (clone C2BBel) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas,VA). Cell monolayers were grown to confluence on collagen-coated, microporous, polycarbonate membranes in 12-well Costar Transwell plates. The permeability assay buffer was Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 10 mM HEPES and 15 mM glucose at a pH of 7.4. The dosing solution concentration was 10  $\mu\text{M}$  of Digoxin (positive control) in the assay buffer +/- 10  $\mu\text{M}$  EC-70124 or 1  $\mu\text{M}$  Valspodar (inhibiting compound). Cells were first pre-incubated for 30 minutes with HBSS containing +/- 10  $\mu\text{M}$  EC-70124 or 1  $\mu\text{M}$  Valspodar. Cell monolayers were then dosed on the apical side (A-to-B) or basolateral side (B-to-A) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Samples were taken from the donor and receiver chambers at 120 minutes. Each determination was performed in duplicate. The flux of lucifer yellow was also measured post-experimentally for each monolayer to ensure no damage was inflicted to the cell monolayers during the flux period. All samples were assayed by LC-MS/MS using electrospray ionization. The apparent permeability ( $P_{app}$ ) and percent recovery were calculated as follows:

$$P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_N}$$

$$\text{Recovery \%} = 100 \times \frac{V_r \times C_r^{final} + V_d \times C_d^{final}}{V_d \times C_N}$$

Where,

- $dC_r / dt$  is the slope of the cumulative concentration in the receiver compartment versus time in  $\mu\text{M s}^{-1}$ ;
- $V_r$  is the volume of the receiver compartment in  $\text{cm}^3$ ;
- $V_d$  is the volume of the donor compartment in  $\text{cm}^3$ ;
- $A$  is the area of the insert ( $1.13 \text{ cm}^2$  for 12-well Transwell);
- $C_N$  is the nominal concentration of the dosing solution in  $\mu\text{M}$ ;
- $C_r$  final is the cumulative receiver concentration in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period;
- $C_d$  final is the concentration of the donor in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period.
- Efflux ratio (ER) is defined as  $P_{\text{app}} (\text{B-to-A}) / P_{\text{app}} (\text{A-to-B})$ .

A summary of experimental results is shown in Table S4.

### **ABCG2/BCRP1 Inhibition Assessment**

BCRP-MDCK cell monolayers were grown to confluence on collagen-coated, microporous, polycarbonate membranes in 12-well Costar Transwell plates. Cell monolayers were grown to confluence on collagen-coated, microporous, polycarbonate membranes in 12-well Costar Transwell plates. The permeability assay buffer was Hanks' balanced salt solution containing 10 mM HEPES and 15 mM glucose at a pH of 7.4. The dosing solution concentration was 10  $\mu\text{M}$  of cladribine in the assay buffer +/- 0.5  $\mu\text{M}$  Ko143 or 10  $\mu\text{M}$  EC-70124. Cell monolayers were first pre-incubated for 30 minutes with assay buffer +/- 0.5  $\mu\text{M}$  Ko143 or 10  $\mu\text{M}$  EC-70124. After 30 minutes the buffer was removed, replaced with fresh dosing solution/assay buffer, and time was recorded as 0. Cell monolayers were dosed on the apical side (A-to-B) or basolateral side (B-to-A) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Samples were taken from the donor and receiver chambers at 120 minutes. Each determination was performed in duplicate. The flux of Lucifer yellow post-experimentally was also measured for each monolayer to ensure no damage was inflicted to the cell monolayers during the flux period. All samples were assayed by LC-MS/MS using electrospray ionization. The apparent permeability ( $P_{\text{app}}$ ) and percent recovery were calculated as follows:

$$P_{app} = \frac{dC_r}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_N}$$



$$Recovery \% = 100 \times \frac{V_r \times C_r^{final} + V_d \times C_d^{final}}{V_d \times C_N}$$

Where,

- $dC_r / dt$  is the slope of the cumulative concentration in the receiver compartment versus time in  $\mu\text{M s}^{-1}$ ;
- $V_r$  is the volume of the receiver compartment in  $\text{cm}^3$ ;
- $V_d$  is the volume of the donor compartment in  $\text{cm}^3$ ;
- $A$  is the area of the insert ( $1.13 \text{ cm}^2$  for 12-well Transwell);
- $C_N$  is the nominal concentration of the dosing solution in  $\mu\text{M}$ ;
- $C_r$  final is the cumulative receiver concentration in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period;
- $C_d$  final is the concentration of the donor in  $\mu\text{M}$  at the end of the incubation period.
- Efflux ratio (ER) is defined as  $P_{app} (\text{B-to-A}) / P_{app} (\text{A-to-B})$ .

A summary of experimental results is shown in Table S5.

### **Xenograft experiments**

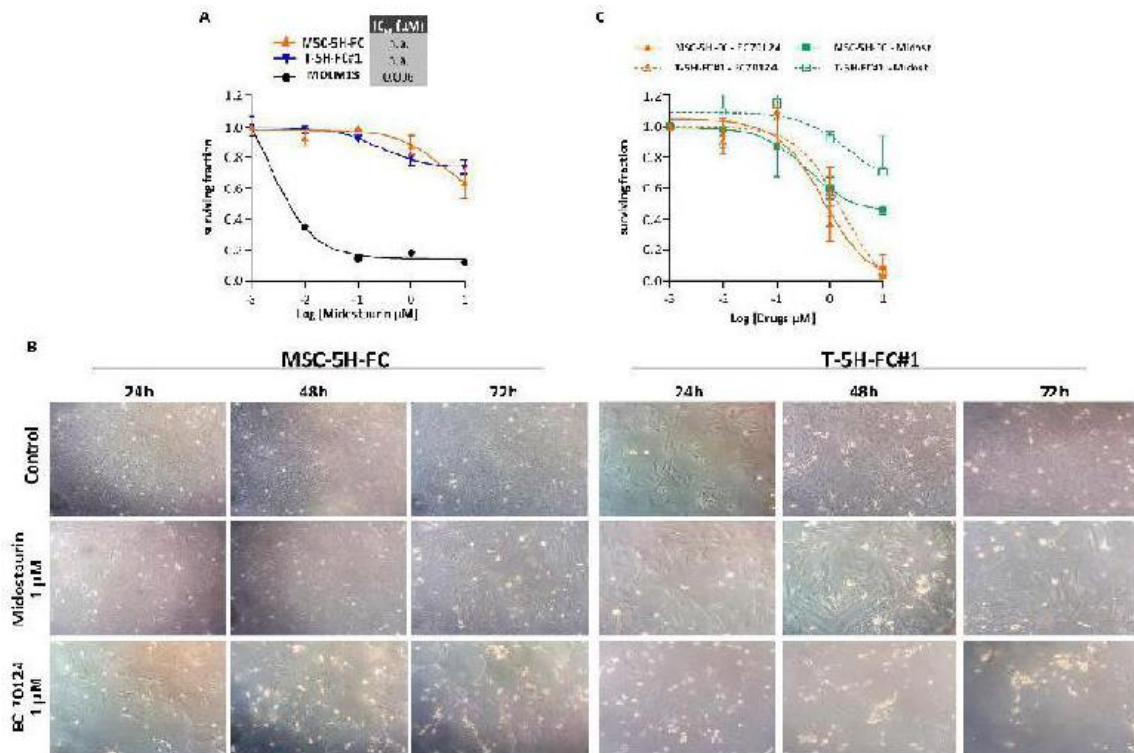
Female mice of 5-6 weeks old (Janvier Labs, St Berthevin, France) were inoculated subcutaneously with  $2 \times 10^6$  T5H-FC#1 cells mixed 1:1 with BD Matrigel Matrix High Concentration (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) previously diluted 1:1 in culture medium. Once tumors reached 200-300  $\text{mm}^3$ , the mice were randomly assigned to receive intra-venous treatments of vehicles (control), EC-70124 at doses of 40 or 80  $\text{mg/Kg}$  every 2 days (alternatively EC-70124 40  $\text{mg/kg}$  was administrated from Monday to Friday) and/or doxorubicin at 4  $\text{mg/kg}$  every 4 days (alternatively doxorubicin 2  $\text{mg/kg}$  was administrated on days 0, 7, 14 and 19). Animals were sacrificed by  $\text{CO}_2$  asphyxiation when tumors of the control series reached approximately 1000  $\text{mm}^3$ . Tumor size was measured with a caliper 2 times a week and tumor volume was determined using the equation  $(D \times d^2)/6 \times 3.14$ , where  $D$  is the maximum diameter and  $d$  is the minimum diameter. Tumor volumes for all mice in each xenograft-treatment group were averaged to obtain the mean tumor volume for the corresponding group. The student t test was performed to determine the statistical significance between groups. Drug efficacy was expressed as the percentage tumor growth inhibition (%TGI), calculated using the equation  $100 - (T/C \times 100)$ , where  $T$  is mean relative

tumor volume [RTV = tumor volume at day of measurement ( $V_t$ ) - tumor volume at the beginning of the treatment ( $V_0$ )] of the treated tumor and C is the mean RTV in the control group at day of measurement. Upon removal, tumors were weighed and processed for immunohistopathology analysis. The lysis buffer composition to prepare protein extracts from tumors using the GentleMACS Dissociator system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was Tris-base 20 mM, NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, Glycerol 10%, Novidet P-40 1%, PMSF 1 mM, Na orthovanadate 1 mM, phosphatase inhibitor Cocktail 1,2 (Sigma P0044 & P5726) 1 % and Complete protease inhibitor cocktail (sigma 11697498001) 1x. All animal research protocols were approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Oviedo prior to the study.

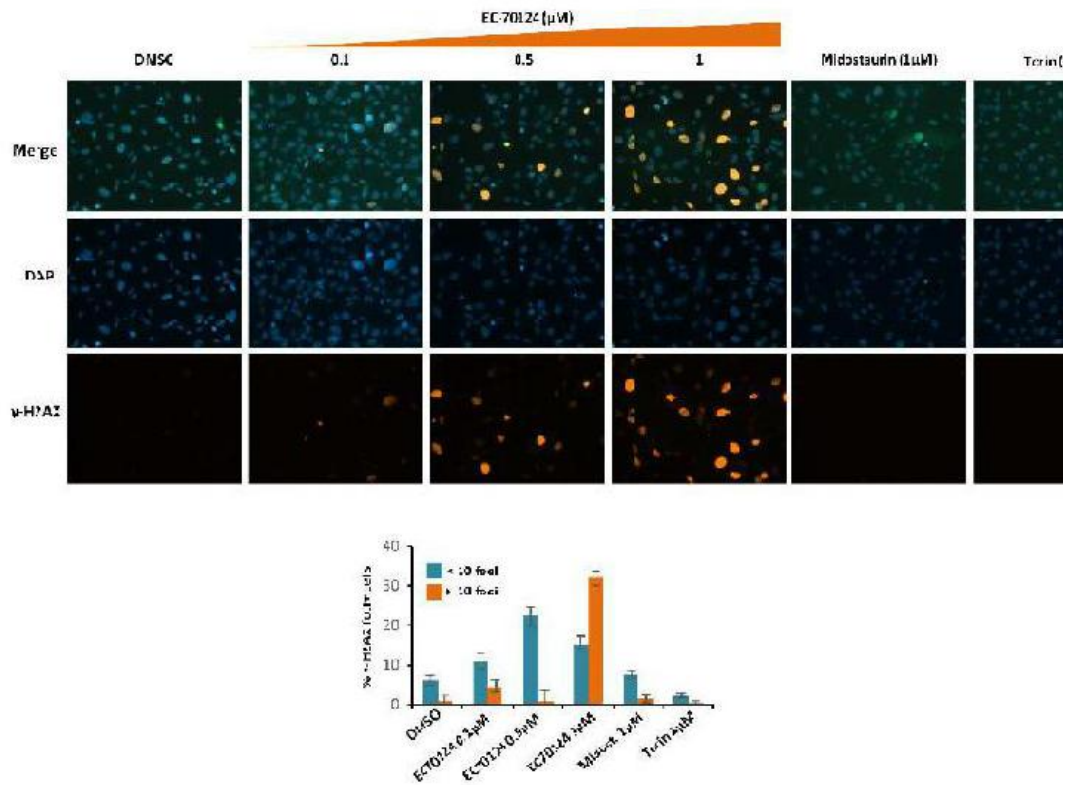
**French Federation of Comprehensive Cancer Centers (FNCLCC) grading system.**

This three grade system is based on the accumulative scoring obtained by three factors: i) tumor differentiation [1 (more differentiated) to 3 (less differentiated)]; ii) presence of necrosis [(0 (no necrosis); 1 (<50% of necrosis); or 2 (>50% of necrosis)]; and iii) mitosis count [1 (0-9 mitotic counts in a high power field (HPF; 40x); 2 (10-19 mitotic counts in a HPF); or 3 (>20 mitotic counts in a HPF)]. Grades I, II and III correspond to accumulative scores of 2-3, 4-5 and 6-8 respectively.

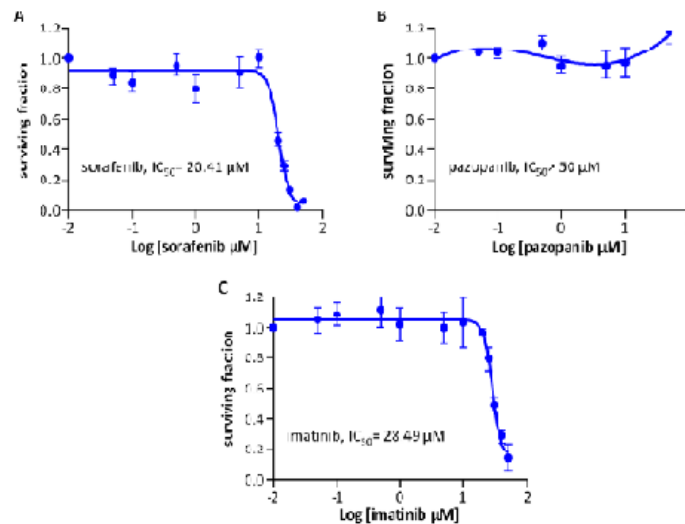
## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Figure S1: Antiproliferative effects of midostaurin and EC-70124.** (A) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of adherent cultures of the indicated cell lines with increasing concentrations of Midostaurin for 48 hours. IC<sub>50</sub> values for each cell type are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments. (B) Representative images of MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cultures treated with 1 μM EC-70124 or midostaurin for the indicated times. (C) Cell viability measured after the treatment of MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 cells tumorsphere cultures with the indicated concentrations of EC-70124, and midostaurin for 72 hours. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.

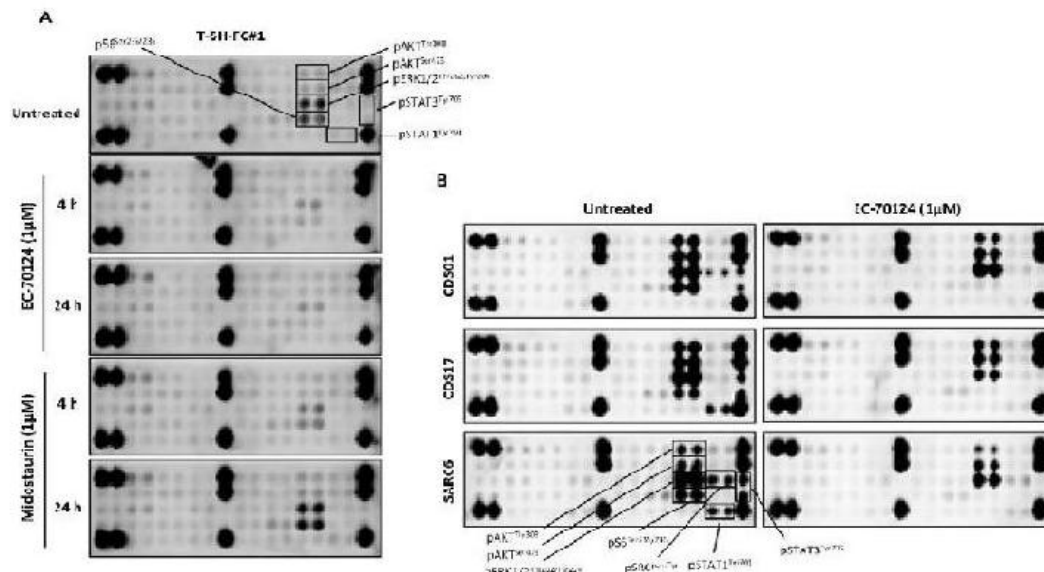


**Figure S2.** Effect of EC-70124, midostaurin and torin on  $\gamma$ H2AX foci formation in T-5H-FC#1 cells. Complete version of the panels displayed in **Figure 1G-H**, including the effects of 1  $\mu$ M torin.



**Figure S3.** Cytotoxic effect of clinically approved multikinase inhibitors. Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of T-5H-FC#1 cells with increasing concentrations

of sorafenib (A), pazopanib (B) or imatinib (C) for 48 hours. IC50 values for each drug are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.



**Figure S4. Kinase inhibitory profiles of indolocarbazole analogs.** (A & B) Complete images of the phospho-kinase antibody arrays presented as **Figures 2A (A)** and **2E (B)** respectively.

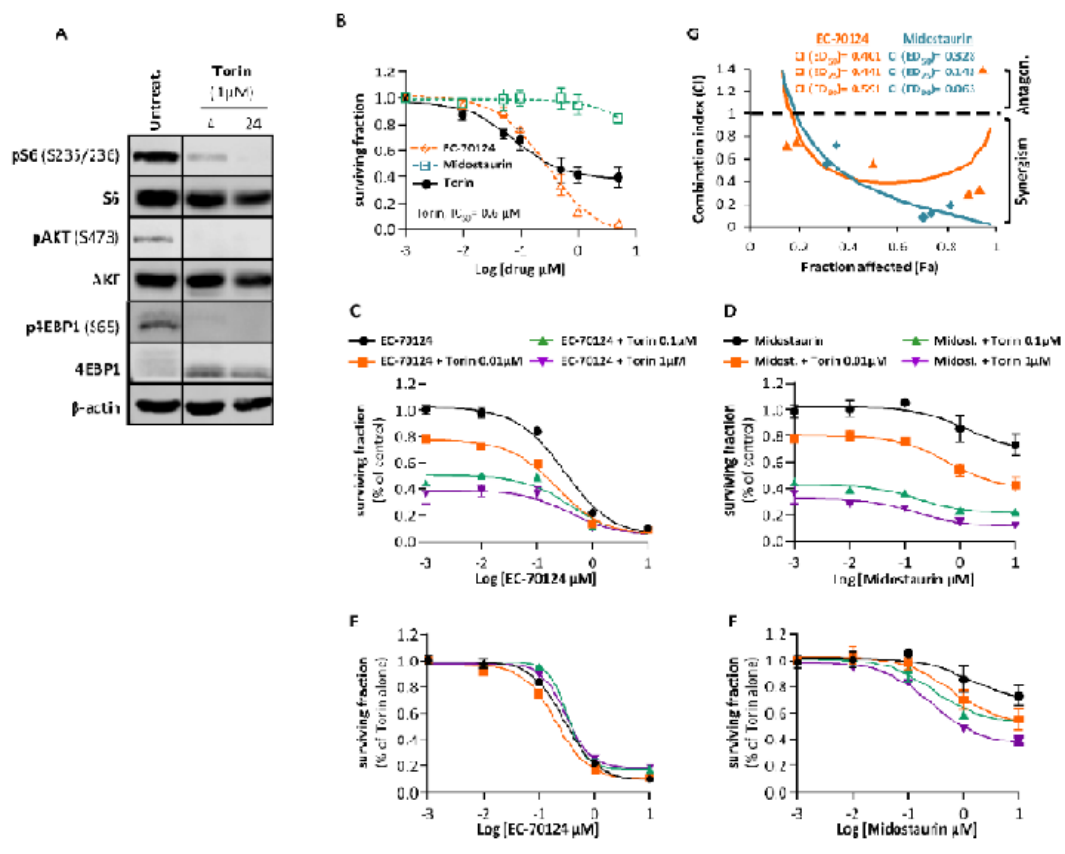
**A**

	untreated	EC-70124 - 1µM		Midostaurin - 1µM	
		4 hours	24 hours	4 hours	24 hours
EGFR/ERK1	0.0095	0.0047	0.0109	0.0059	0.0105
EGFR/Erk2	0.0059	0.0132	0.0213	0.0223	0.0205
FGFR/Erk4	0.0114	0.0178	0.0303	0.0144	0.0145
FGFR1	0.0196	0.0347	0.0536	0.0137	0.0638
FGFR3	0.0141	0.0168	0.0165	0.0141	0.0157
FGFR4	0.0958	0.0252	0.0311	0.0413	0.0575
InsR	0.0122	0.0075	0.0118	0.0100	0.0073
Igf-1R	0.0057	0.0045	0.0086	0.0087	0.0084
TrkA/NTRK1	0.0144	0.0038	0.0107	0.0143	0.0128
TrkA/NTRK2	0.0222	0.0090	0.0141	0.0217	0.0222
Ntrk3/NGFR	0.0046	0.0000	0.0046	0.0047	0.0058
Ron/MST1R	0.0152	0.0095	0.0136	0.0175	0.0134
Ret	0.0043	0.0048	0.0056	0.0080	0.0040
ALK	0.0045	0.0020	0.0026	0.0015	0.0034
PDGFR	0.0058	0.0078	0.0072	0.0075	0.0088
c-KIT/SCFR	0.0120	0.0112	0.0162	0.0230	0.0220
FLT3/Flt3	0.0030	0.0034	0.0033	0.0051	0.0078
M-CSFR/CSF-1R	0.0173	0.0110	0.0117	0.0151	0.0174
EphA1	0.0081	0.0213	0.0138	0.0083	0.0156
EphA2	0.0133	0.0165	0.0145	0.0143	0.0141
EphA3	0.0091	0.0073	0.0074	0.0074	0.0104
EphB1	0.0118	0.0085	0.0104	0.0094	0.0125
EphB3	0.0052	0.0045	0.0048	0.0021	0.0050
EphB4	0.0082	0.0129	0.0139	0.0115	0.0133
Tyros-3/Dtk	0.0048	0.0089	0.0131	0.0042	0.0048
Axl	0.0103	0.0048	0.0108	0.0114	0.0112
Tie2/TEK	0.0910	0.0175	0.0786	0.0513	0.0617
VEGFR2/KDR	0.0132	0.0164	0.0150	0.0135	0.0138
Alet (Tyr308)	0.0943	0.0138	0.0183	0.0233	0.0178
Akt (Ser473)	0.0057	0.0097	0.0187	0.0245	0.0431
ERK1/2 (Tyr202/204)	0.0539	0.0527	0.0501	0.0791	0.1581
Sh (Ser245/246)	0.2568	0.0315	0.0204	0.0235	0.1581
C-Abl	0.0074	0.0041	0.0090	0.0055	0.0125
IRS-1	0.0205	0.0137	0.0171	0.0177	0.0188
Zfp-70	0.0172	0.0109	0.0181	0.0155	0.0225
Src	0.0053	0.0053	0.0062	0.0041	0.0074
Lck	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Shc1 (Tyr204)	0.0833	0.0048	0.0136	0.0110	0.0552
Shc2 (Tyr204)	0.0110	0.0131	0.0162	0.0041	0.0128

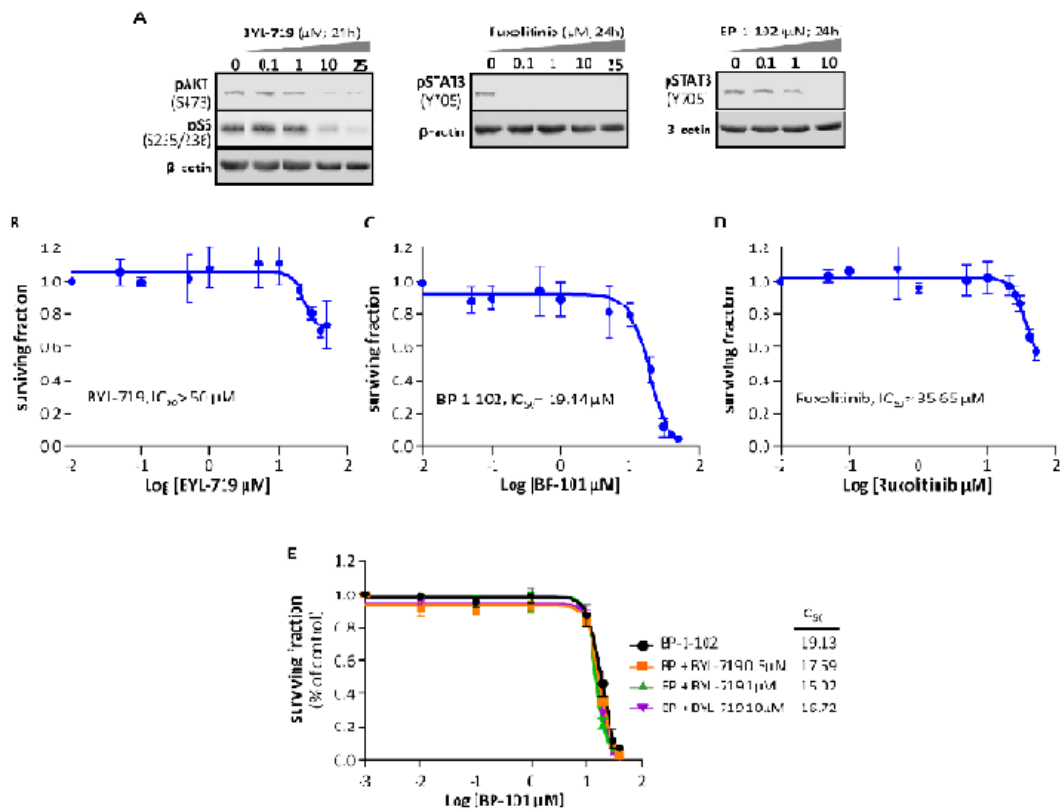
**B**

	CD501		CD517		S/R016	
	untreated	EC-70124 (1µM)	untreated	EC-70124 (1µM)	untreated	EC-70124 (1µM)
EGFR/Erk1	0.0212	0.0000	0.0135	0.0105	0.0299	0.0077
EGFR/Erk2	0.0217	0.0240	0.0378	0.0205	0.0037	0.0221
FGFR/Erk4	0.0048	0.0040	0.0071	0.0175	0.0094	0.0044
FGFR1	0.0625	0.0056	0.0551	0.0731	0.0602	0.0551
FGFR3	0.0062	0.0161	0.0305	0.0305	0.0043	0.0221
FGFR4	0.0350	0.0358	0.0416	0.0405	0.0090	0.0307
InsR	0.0140	0.0101	0.0162	0.0129	0.0135	0.0081
Igf-1R	0.0117	0.0098	0.0146	0.0072	0.0132	0.0091
TrkA/NTRK1	0.0254	0.0145	0.0359	0.0287	0.0046	0.0261
TrkA/NTRK2	0.0185	0.0166	0.0213	0.0217	0.0014	0.0151
Ntrk3/NGFR	0.0063	0.0012	0.0059	0.0044	0.0054	0.0024
Ron/MST1R	0.0220	0.0128	0.0261	0.0165	0.0238	0.0144
Ret	0.0062	0.0062	0.0062	0.0040	0.0043	0.0011
ALK	0.0007	0.0051	0.0034	0.0017	0.0070	0.0034
PDGFR	0.0084	0.0111	0.0100	0.0111	0.0133	0.0034
c-KIT/SCFR	0.0037	0.0042	0.0026	0.0043	0.0088	0.0022
FLT3/Flt3	0.0012	0.0065	0.0042	0.0041	0.0078	0.0031
M-CSFR/CSF-1R	0.0018	0.0058	0.0038	0.0061	0.0068	0.0034
EphA1	0.0179	0.0115	0.0124	0.0187	0.0099	0.0103
EphA2	0.0153	0.0116	0.0157	0.0137	0.0159	0.0204
EphA3	0.0162	0.0096	0.0131	0.0157	0.0159	0.0141
EphB1	0.0113	0.0120	0.0148	0.0122	0.0185	0.0087
EphB3	0.0204	0.0013	0.0060	0.0060	0.0016	0.0009
EphB4	0.0213	0.0110	0.0260	0.0220	0.0081	0.0181
Tyros-3/Dtk	0.0171	0.0171	0.0076	0.0085	0.0119	0.0061
Axl	0.0148	0.0186	0.0085	0.0175	0.0192	0.0191
Tie2/TEK	0.0640	0.0127	0.0805	0.0535	0.0171	0.0411
VEGFR2/KDR	0.0140	0.0165	0.0217	0.0165	0.0182	0.0117
Alet (Tyr308)	0.4684	0.1580	0.3554	0.2425	0.2642	0.1231
Akt (Ser473)	0.0089	0.0119	0.0087	0.0089	0.0018	0.0014
ERK1/2 (Tyr202/204)	1.3669	1.9024	3.0017	0.2785	4.3522	0.8911
Sh (Ser245/246)	0.0088	0.0144	1.0064	0.0175	1.5012	0.0103
C-Abl	0.0127	0.0073	0.0186	0.0181	0.0010	0.0103
IRS-1	0.0557	0.0249	0.0414	0.0568	0.0481	0.0214
Zfp-70	0.0132	0.0166	0.0167	0.0233	0.0159	0.0134
Src	2.1194	0.0550	0.0281	0.0222	2.1427	0.0001
Lck	0.0000	0.0000	0.0029	0.0029	0.0000	0.0007
Shc1 (Tyr204)	0.0266	0.0022	0.0067	0.0154	0.1522	0.0001
Shc2 (Tyr204)	1.7142	0.0167	1.3559	0.0161	1.7147	0.0001

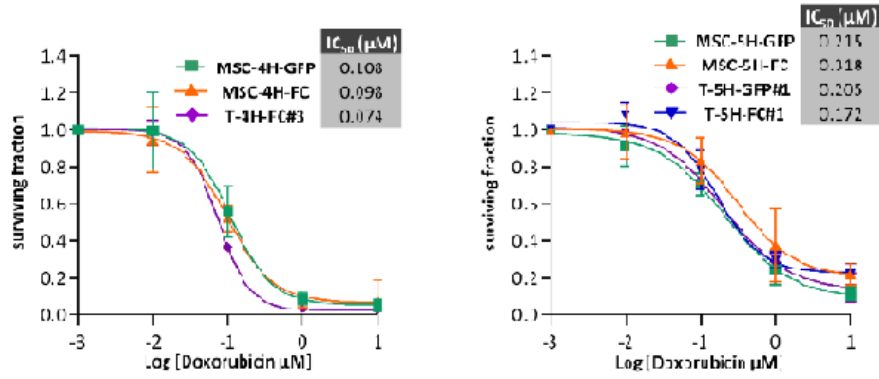
**Figure S5. Quantification of phospho-kinase antibody arrays.** (A-B) Complete quantification of the phospho-kinase antibody arrays presented in **Figure 2A** and **S4A** using T-5H-FC#1 cells (A) and in **Figures 2E** and **S4B** using the indicated primary cell lines (B).



**Figure S6. Role of mTOR signaling inhibition in EC-70124-induced cytotoxicity.** (A) Western blotting analysis of the indicated indicated proteins in T-5H-FC#1 cells treated with 1 μM torin for the indicated times. (B) Cell viability measured after the treatment of T-5H-FC#1 cells with increasing concentrations of EC-70124, midostaurin and torin for 48 hours. (C-D) Dose-response curves of cell viability normalized to the solvent control after 48 hours of treatment of T-5H-FC#1 cells with combinations of EC-70124 with torin (C) and midostaurin with torin (D). (E-F) Dose-response cell viability curves where the EC-70124 + torin (E) and midostaurin + torin (F) series were normalized to the value observed after treatment with torin alone. In this representation the effect of torin alone is subtracted from the combination values, thus, allowing to show any shift in the IC50 of EC-70124 or midostaurin due to the combination. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments. (G) Combination index plots generated for 6 constant ratio combinations of EC-70124 and torin (1:1) and midostaurin and torin (1:1) using the CompuSyn software according to the Chou-Talalay method. The CI values for ED50, ED75 and ED90 combination doses as calculated by the median effect equation are shown.



**Figure S7. Cytotoxic effect of PI3K and JAK/STAT inhibitors.** (A) Western blotting analysis showing the dose-response effect of torin (mTOR inhibitor), BYL-719 (PI3K inhibitor), ruxolitinib (JAK1/2 inhibitor) or BP-1-102 (STAT3 inhibitor) on the indicated phospho-proteins after the treatment of T-5H-FC#1 cells for 24 hours. (B-D) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of T-5H-FC#1 cells with increasing concentrations of BYL-719 (B), BP-1-102 (C) or ruxolitinib (D) for 48 hours. (E-F) Cell viability normalized to the solvent control after 48 h of treatment of T-5H-FC#1 cells with combinations of torin with BP-1-102 (E) and BP-1-102 with BYL-719 (F).  $IC_{50}$  values for each drug/drug combination are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.



**Figure S8. Antiproliferative effects of doxorubicin.** Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of adherent cultures of the indicated MSC-4H and T-4H (left panel) and MSC-5H and T-5H (right panel) cell lines with increasing concentrations of doxorubicin for 48 hours. IC<sub>50</sub> values for each cell type are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.



## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1. Transforming mutations and oncogenic status of the MSC cell types and tumor cell lines used in this study.**

BM-hMSC	Hit#1	Hit#2	Hit#3	Hit#4	Hit#5	Hit#6	Oncogenic status	Tumor type
<b>BMSC</b>	-	-	-	-	-	-	wild type	-
<b>hMSC-4H-GFP</b>	ectopic expression of hTERT	inactivation of P53 by expression of E6 antigen of the HPV16	inactivation of RB by expression of E7 antigen of the HPV16	introduction of SV40 small T antigen to inactivate the PPA2 phosphatase leading to the stabilization of C-MYC	-	GFP	immortalized	-
<b>hMSC-4H-FC</b>						FUS-CHOP	transformed	myxoid liposarcoma
<b>T-4H-FC#3</b>						FUS-CHOP	xenograft-derived line	myxoid liposarcoma
<b>hMSC-5H-GFP</b>						GFP	transformed	Undiff. sarcoma
<b>hMSC-5H-FC</b>					expression of oncogenic H-RAS <sup>v-12</sup>	FUS-CHOP	transformed	myxoid liposarcoma
<b>T-5H-GFP#1</b>					GFP	xenograft-derived line	Undiff. sarcoma	
<b>T-5H-FC#1</b>					FUS-CHOP	xenograft-derived line	myxoid liposarcoma	

**Table S2. Patient and tumor characteristics**

Cell line	Age at diagnosis	Gender	Tumor location	Diagnosis*
<b>CDS 01</b>	27	female	skull base	low grade chondrosarcoma
<b>CDS 11</b>	61	male	scapula	low grade chondrosarcoma
<b>CDS 17</b>	49	male	hemipelvis	high grade dedifferentiated chondrosarcoma
<b>SARC 01</b>	62	male	forearm	relapsed extraskeletal osteosarcoma
<b>SARC 03</b>	61	male	thigh	undifferentiated pleomorphic sarcoma
<b>SARC 04</b>	44	female	leg	fibrosarcoma
<b>SARC 06</b>	52	male	thigh	undifferentiated pleomorphic sarcoma
<b>GIST 01</b>	50	male	stomach	gastrointestinal stromal tumor

(\*). None of the patients received chemotherapy or radiotherapy before the surgery and the derivation of the cell line.

**Table S3.** Comparison of the EC-70124 and midostaurin dissociation constants for selected kinases

Kinase	Kd (nmol/L)	
	Midostaurin	EC-70124
AURKA	120	21
AURKB	62	9
AURKC	170	28
CHEK1	1300	9
RSK2	740	2.5
RSK3	730	13
RSK4	1500	2.7
S6K1	1300	9.4

Note: KdELECT® Kinase Assay run by DiscoverX.

**Table S4.** Experimental results of ABCB1/MDR1 Inhibition Assays

Compound	Direction	Recovery (%)	Papp (10 <sup>-6</sup> cm/s)			Efflux Ratio	ABCB1 substrate classification
			R1	R2	AVG		
Digoxin	A-to-B	88	0.79	0.77	0.78	16	-
	B-to-A	95	12.2	122	12.2		
Digoxin + 10µM EC-70124	A-to-B	85	2.95	2.67	2.81	1.6	Positive
	B-to-A	98	4.71	4.34	4.52		
Digoxin + 1µM Valspodar	A-to-B	86	2.63	2.65	2.64	1.0	Positive
	B-to-A	98	2.62	2.61	2.61		

Criteria for Inhibition Potential Classification:

ER ≥ 2.0 without inhibitor, and reduced by ≥ 50% with inhibitor: Positive

ER ≥ 2.0 without inhibitor, and reduced by < 50% with inhibitor: Negative

ER < 2.0 without and with inhibitor: Negative

**Table S5. Experimental results of ABCG2/BCRP1 Inhibition Assays**

Compound	Direction	Recovery (%)	Papp ( $10^{-6}$ cm/s)			Efflux Ratio	ABCG2 substrate classification
			R1	R2	AVG		
Cladribine	A-to-B	89	0.06	0.05	0.06	352	-
	B-to-A	91	21.5	19.1	20.3		
Cladribine + 10 $\mu$ M EC-70124	A-to-B	88	0.32	0.23	0.28	13	<b>Positive</b>
	B-to-A	95	3.61	3.80	3.70		
Cladribine + 0.5 $\mu$ M Ko143	A-to-B	86	0.24	0.17	0.20	0.9	<b>Positive</b>
	B-to-A	90	0.18	0.20	0.19		

Criteria for Inhibition Potential Classification:

ER  $\geq$  2.0 without inhibitor, and reduced by  $\geq$  50% with inhibitor: Positive

ER  $\geq$  2.0 without inhibitor, and reduced by  $<$  50% with inhibitor: Negative

ER  $<$  2.0 without and with inhibitor: Negative

**Table S6. Experimental results of ABCB1/MDR1 and ABCG2/BCRP1 Substrate Assays**

Compound	Direction	Recovery (%)	Papp (10 <sup>-6</sup> cm/s)			Efflux Ratio	ABCB1 / ABCG2 substrate classification
			R1	R2	AVG		
EC-70124	A-to-B	38	14.6	12.5	13.6	0.9	-
	B-to-A	67	11.0	12.6	11.8		
EC-70124 + 1 μM Valspodar	A-to-B	32	13.3	11.3	12.3	0.7	Negative
	B-to-A	77	9.11	8.13	8.62		
EC-70124 + 0.5 μM Ko143	A-to-B	27	14.3	12.5	13.4	1.1	Negative
	B-to-A	65	16.4	13.1	14.7		
Digoxin	A-to-B	88	0.79	0.77	0.78	16	Positive
		85	12.2	12.2	12.2		
Digoxin + 1 μM Valspodar	A-to-B	86	2.63	2.65	2.64	1.0	
	B-to-A	98	2.62	2.61	2.61		
Cladribine	A-to-B	87	0.98	0.95	0.96	17	Positive
	B-to-A	86	16.5	16.0	16.3		
Cladribine + 0.5 μM Ko143	A-to-B	83	1.51	1.33	1.42	1.0	
	B-to-A	90	1.45	1.41	1.43		

Criteria for Substrate Classification:

ER ≥ 2.0 without inhibitor, and reduced by ≥ 50% with inhibitor: Positive

ER ≥ 2.0 without inhibitor, and reduced by < 50% with inhibitor: Negative

ER < 2.0 without and with inhibitor: Negative

## REFERENCES

3. Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, Clements MO, Bourboulia D, Pedley RB, Moncada S, et al (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6223-6228.
4. Rodriguez R, Tornin J, Suarez C, Astudillo A, Rubio R, Yauk C, Williams A, Rosu-Myles M, Funes JM, Boshoff C, et al (2013). Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem Cells* 31, 2061-2072.
5. Chou TC (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58, 621-681.

**2.2 Objetivo 2: Encapsulación del agente antineoplásico mitramicina en anotransportadores para la mejora de su ventana terapéutica en el tratamiento de sarcomas.**

i) Diseño de varios nanotransportadores de formulación estable e inócua para el organismo con capacidad de encapsular eficientemente MTM y con un rango de tamaños monodisperso e idóneo para su acumulación en la región tumoral; ii) Caracterización de los mecanismos involucrados en la actividad antineoplásica de la MTM en sarcomas; iii) Evaluación del efecto de la encapsulación de la MTM su su actividad antineoplásica.

### **2.2.1. Artículo 2:** Nanoencapsulation of mithramycin in transfersomes and polymeric micells for the treatment of sarcomas

#### **NANOENCAPSULATION OF MITHRAMYCIN IN TRANSFERSOMES AND POLYMERIC MICELLS FOR THE TREATMENT OF SARCOMAS**

Oscar Estupiñán<sup>1,2,3,4</sup>, Claudia Rendueles<sup>4</sup>, Paula Suarez<sup>4</sup>, Verónica Rey<sup>1,2</sup>, Dzohara Murillo<sup>1</sup>, Francisco Moris<sup>5</sup>, Gemma Gutiérrez<sup>4,6</sup>, María del Carmen Blanco-López<sup>6,7</sup>, María Matos<sup>4,6</sup>, and René Rodríguez<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n 33011 Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>3</sup>CIBER en oncología (CIBERONC), Madrid, Spain. <sup>4</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Oviedo, Spain. <sup>5</sup>EntreChem SL, Oviedo, Spain. <sup>6</sup>Asturias University Institute of Biotechnology, University of Oviedo, Spain. <sup>7</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Spain.

#### **ABSTRACT**

Sarcomas are aggressive tumors which often show a poor response to current treatments. As a promising therapeutic alternative, we focused on mithramycin (MTM), a natural antibiotic with a promising anti-tumor activity but also a relevant systemic toxicity. Therefore, the encapsulation of MTM in nano-delivery systems may represent a way to increase its therapeutic window. Here, we designed novel transfersomes and PLGA polymeric micelles by combining different membrane components (phosphatidylcholine, Span 60, Tween 20 and cholesterol) to optimize the nanoparticle size, polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (EE). Using both thin film hydration and the ethanol injection methods we obtained MTM-loaded transfersomes displaying an optimal hydrodynamic diameter of 100–130 nm and EE values higher than 50%. Additionally, we used the emulsion/solvent evaporation method to synthesize polymeric micelles with a mean size of 228 nm and a narrow PDI, capable of encapsulating MTM with EE values up to 87%. These MTM nano-delivery systems mimicked the potent anti-tumor activity of free MTM, both in adherent and cancer stem cell-enriched tumorsphere cultures of myxoid liposarcoma and chondrosarcoma models. Similarly to free MTM, nanocarrier-delivered MTM efficiently inhibits the signaling mediated by them pro-oncogenic factor SP1. In summary, we provide

new formulations for the efficient encapsulation of MTM which may constitute a safer delivering alternative to be explored in future clinical uses.

**Keywords:** mithramycin; sarcoma; liposarcoma; chondrosarcoma; encapsulation; transfersomes; nanovesicles; PLGA, micelles.

**Conflicts of Interest:** F.M is employee and reports ownership of stock in of EntreChem SL. All other authors declare they have no competing interests. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

**DOI:** <https://doi.org/10.3390/jcm10071358>

**History:** Received: 25 February 2021 / Revised: 13 March 2021 / Accepted: 22 March 2021 / Published: 25 March 2021

**Correspondence to:** Rene Rodriguez, Laboratorio ORL–IUOPA, Hospital Universitario Central de Asturias - Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Av. de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain, Tel.: 00-34-985107956, E-mail: renerg.finba@gmail.com or E-mail: rodriguezrene.uo@uniovi.es. María Matos, Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Oviedo, Av. Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Asturias, Spain, E-mail: matosmaria@uniovi.es

## INTRODUCTION

Sarcomas comprise a heterogeneous group of malignant neoplasms that arise from mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) and therefore affect mesodermal tissues such as bones, muscles, cartilage or fat. Although these tumors involve only 1% of global cancer diagnoses, this value rises to 12%–15% in terms of pediatric malignancies [1]. In general terms, the treatment of localized sarcomas involves the surgical resection of tumor mass supported by radiotherapy or neoadjuvant chemotherapy [2,3]. In the case of advanced disease or if surgery is not feasible, current treatments still rely on protocols using different cytotoxic drugs. As a result, the overall survival of these patients has remained unchanged for the last 30 years and below 20% in the case of metastatic osteosarcomas and soft tissue sarcomas [2,3], thus highlighting the need for more efficient therapies.



In recent years, several compounds with anti-tumor activity in sarcomas have been reported. Among them, mithramycin A (MTM), also known as Plicamycin, is a natural aureolic acid-type polyketide that was originally isolated from *Streptomyces agrillaceus* [4]. MTM is able to bind to the DNA minor groove in areas with high GC density, thus inhibiting pivotal transcription factors, such as SP1 and SP3, known to control key oncogenic pathways in cancer [5]. MTM has been used in the past as a therapeutic agent to treat several cancer types, including Ewing sarcoma, in which MTM was able to inhibit its characteristic EWS-FLI1 transcription factor [6]. However, despite its promising efficacy, MTM's severe side effects have precluded its clinical use at doses which are required to achieve therapeutic responses [7,8]. Nevertheless, new findings describing specific mechanisms of action and drug combinations with synergistic activity in different types of tumors have triggered renewed interest in MTM [6,9–11]. In addition, the anti-tumor effects of MTM and related compounds also include strong potential to inhibit the stemness properties in several types of tumors [12–17].

Drug delivery using nanocarriers is an interesting option to improve the therapeutic, pharmacological and safety properties of anti-tumor drugs [18]. Thus, the use of nanocarrier systems offers a wide range of possibilities to overcome the multiple physiological barriers that anti-tumor agents must cross, as well as to increase their absorption, distribution and stability in the blood [19,20]. The preferential accumulation of drug-loaded nanocarriers in the tumor is favored by the EPR (enhanced permeability and retention) effect [21], and it may also be actively achieved through the functionalization of the nanoparticles with peptides, aptamers or antibodies, to recognize specific structures in cancer cells [22]. Therefore, some therapeutic nanoparticles (e.g., Doxil®, nal-IRI) have received clinical approval for cancer treatment, including sarcomas [23,24].

The use of nanocarriers is especially relevant for drugs like MTM, which show a strong anti-tumoral activity, but a narrow therapeutic window. However, MTM is highly hydrophilic, which makes it more difficult to entrap it using nanocolloids. MTM has been encapsulated before using poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [25,26] and other types of polymeric micelles [27] and liposomes [28] as nanocarriers. Interestingly, MTM–PGLA nanoparticles demonstrated a higher anti-tumor activity than free MTM in pancreatic cancer models [26]. PLGA nanoparticles are composed of innocuous and biodegradable polymers formed from

co-polymerization of glycolic acid and lactic acid [20]. In addition to polymeric nanoparticles, liposomes and their derivatives are also commonly used for the encapsulation of drugs [29]. Among them, transfersomes are especially flexible and deformable nanovesicles (NVs) with membranes containing a combination of phospholipids (membrane stability), and single chain surfactants (membrane flexibility) [30]. In this work, we designed novel transfersomes and PLGA polymeric micelles able to encapsulate MTM with high efficiency. These drug-delivery systems displayed an optimal average hydrodynamic diameter of 100–200 nm and narrow polydispersity index. In addition, we confirmed the anti-tumor potential of encapsulated MTM in different sarcoma models.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Phosphatidylcholine (PC) (predominant species: C<sub>42</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>8</sub>P, MW= 775.04 g/mol) from soybean (Phospholipon 90G) was a kind gift from Lipoid (Germany). Poly (lactico-glycolic acid) (PLGA) (LG 50:50, Mw 24–38 kDa), Sorbitan monostearate (Span 60, S60) (C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>, MW = 430.62 g/mol), Polisorbate 20 (Tween<sup>®</sup> 20, T20) (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>, MM = 1227 g/mol) and Cholesterol (Cho) (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O, MW = 386.65 g/mol) were purchased from Sigma Aldrich (USA). All membrane components were dissolved in absolute ethanol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). For the encapsulation experiments 1,2-dioleoyl-snglycero-3-phosphocholine-N-(Cyanine 5) supplied by Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) was used as fluorescent marker in order to observe under confocal microscopy the nanocolloids and cell interactions. Methanol, acetonitrile, 2-propanol, and the acetic acid of HPLC-grade were supplied by Sigma-Aldrich (USA). A sterile phosphate buffer saline solution (PBS) was used in all experiments as the aqueous phase.

### Synthesis of PLGA polymeric micelles

In the first set of experiments, several formulations were prepared in order to achieve the proper size, polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (EE) required to later perform cell tests. These polymeric micelles were prepared by the emulsion solvent evaporation method. An organic phase was prepared with 12.5% (v/v) methanol in chloroform. PLGA (10 mg/mL) was dissolved in this organic phase. The aqueous phase was prepared with polyvinyl alcohol 1% (w/v) and membrane compounds. These compounds were S60, PC and Cho, using different molar ratios (for a total of 8.7 mg in 25 mL). For

encapsulation studies, MTM was added on the organic phase. Two milliliters (2 mL) of organic phase were mixed with 6 mL of the aqueous phase and this was sonicated at 2 min (50%) until an emulsion was formed. This emulsion was left under stirring overnight to eliminate the organic phase.

### **Synthesis of transfersomes**

For the optimization of the size, PDI and EE of these NVs, four different formulations were studied and two different methods of synthesis were used: thin film hydration (TFH) and ethanol injection method (EIM).

Thin film hydration (TFH): Transfersomes were prepared by weighing and dissolving in absolute ethanol PC, S60, T20 and Cho in 1:0.5:0.5:0.5 (TFS1); 1:1.5:1.5:1 (TFS2); 3:3:3:1 (TFS3) and 1.5:1:0.5:1 (TFS4) weight ratios to a concentration of 40 g/L. Then, 100 µL of the organic solution was added to a test tube and the organic solvent was removed using a flow of nitrogen to form a lipid film. The film was rehydrated by adding 2 mL PBS solution, so the final concentration of membrane components was 2 g/L. The resulting vesicular systems were further sonicated for 2 min using an amplitude of 55%.

Ethanol injection method (EIM): Transfersomes were prepared by dissolving the appropriate amount of PC, S60, T20 and Cho in 5 mL of absolute ethanol, for a concentration of 20 g/L. The organic phase was injected, with a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA) at a flow rate of 120 mL/h, into Milli-Q water that was kept at 60°C and stirred at 500 rpm, so the final concentration of membrane components in aqueous phase was 2 g/L. Then, the ethanol was removed at 40°C under low pressure (65 mbar) using a rotary vapor. Finally, the vesicular systems were sonicated for 2 min at 55% of amplitude.

For MTM-loaded transfersomes, the same procedure was applied and MTM was added to the organic solution to obtain a final concentration of 1 mg/mL in the aqueous phase (PBS).

### **Nanocolloids characterization**

Nanocolloids size: Mean Z-average size and PDI of vesicles were determined via Dynamic Light Scattering (DSL) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Three independent samples were taken from each formulation, and measurements were carried out three times at room temperature without dilution.

Nanocolloids Morphology: The morphological analysis of nanocolloids was carried out by negative staining transmission electron microscopy (NS-TEM), using a JEOL-2000 Ex II TEM (Japan). A sample drop was placed on a carbon-coated copper grid and the sample excess was removed using filter paper.

For the NVs' characterization, a drop of 2% (w/v) phosphotungstic acid solution (PTA) was applied to the carbon grid and left to stand for 1 min. Once the excess staining agent was removed with filter paper, the sample was air-dried and the thin film of stained and fixed NVs was observed with the transmission electron microscope.

Encapsulation Efficiency (EE): EE also gives useful information related to the stability of the vesicle membrane. Hydrophilic compounds are commonly entrapped in the aqueous core surrounded by the lipidic bilayer, while lipophilic components are preferentially located within the surfactant or lipid bilayer [31]. MTM was analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (HP series 1100 chromatograph, Hewlett Packard, USA). Before performing these analyses, non-encapsulated MTM was removed by using centrifugal filter units (EMD Millipore™ Amicon™ Ultra-0.5 centrifugal filter units). Centrifugation was carried out for 20 min at 14600 rpm. Nanocolloids retained in the filter were resuspended in 500 µL sterile PBS solution.

The RP-HPLC system was equipped with a UV/VIS absorbance detector HP G1315A and a fluorescence detector 1260 Infinity A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The column was a Zorbax Eclipse Plus C18 of 5 µm particle size, 4.6 mm × 150 mm (Agilent Technologies, USA). The mobile phase consisted of a mixture of (A) 100% milliQ-water; and (B) 100% methanol with gradient elution at 0.8 mL/min. The step gradient started with a mobile phase of 80%: (A) running 100% mobile phase; (B) in minute 5 for 10 min. The mobile phase (B) was fed for 2 min after each injection to prepare the column for the next sample. The analysis was carried out at 30 °C. The wavelength used for UV/VIS detector was 280 nm.

### **Cell culture, drugs and ethics statement**

The myxoid liposarcoma model cell line MSC-5H-FC was generated by the sequential transformation of human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells (hBMSCs) with up to six oncogenic hits, including the fusion oncogene FUS-CHOP (FC),

as previously reported and characterized [32,33]. The related cell line T-5H-FC#1 was derived from a xenograft tumor generated by MSC-5H-FC cells [33,34]. T-CDS17#4 is a cell line derived from a xenograft generated by the chondrosarcoma primary cell line CDS17, which were fully described in a preceding work [35]. Healthy human BM-MSCs were obtained from Inbiobank (San Sebastian, Spain) and were functionally and phenotypically characterized in a previous work [32]. The identity of these cell lines has been authenticated by a short tandem repeats analysis during the last 5 months. All the cell lines were tested monthly for mycoplasma using the LONZA MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (LONZA, Rockland CE) and cultured as previously described [33,35]. MTM was synthesized by EntreChem SL (Oviedo, Spain) as previously described [36]. Stocks of MTM were prepared as 10 mM solutions in DMSO, maintained at 20 °C, and diluted in culture medium to the final concentration just before use. All experimental protocols have been performed in accordance with institutional review board guidelines and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Principado de Asturias (ref. 255/19).

### **Cell viability assays**

Cell viability of cell lines after the treatment with increasing concentrations of free MTM or MTM encapsulated in different nanocarriers was assayed using the Cell Proliferation reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) as described before [37]. The concentration of the half-maximal inhibition of viability (IC<sub>50</sub>) for each condition was calculated by nonlinear regression using the GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA).

### **Tumorsphere culture**

Cells were plated at a density of 5000 cells per well in 6-well low-attachment plates (Sigma, St Louis, MO, USA) and cultured in serum-free sphere medium containing DMEM-F12 (GE Healthcare, Pittsburg, PA, USA) supplemented with Glutamax (1:100; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), B-27 Supplement (1:50; Life Technologies), Heparin (1:1000; Sigma), the growth factors human EGF (20 ng/mL) and human bFGF (10 ng/ml; PeproTech, London, UK). Fresh aliquots of EGF and bFGF were added every three days. To analyze the effects of drugs, the tumorspheres formed after 10 days of culture were incubated in sphere medium containing different concentrations of the drugs for 3 days. After the treatments, tumorspheres were scored and cell viability was determined using the Cell Proliferation reagent WST-1. [38].

### **Western blotting**

The preparation of protein extracts and the protocol for Western blotting analysis were previously reported [39]. The following primary antibodies were used at the indicated dilutions: anti-SP1 [(9389), 1:1000 dilution] from Cell Signaling (Danvers, MA, USA); anti-cMYC [(sc-40), 1:100], anti-VEGF [(sc-57496), 1:100], and anti-IGF1-R [(sc-81464), 1:100] from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); and anti- $\beta$ -Actin [(A5441), 1:10,000] from Sigma. IRDye Infrared Fluorescent secondary antibodies IRDye 800CW and IRDye-680RD (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) were used for signal detection using an Odyssey Fc imaging system and the software Image Studio (LICOR). Uncropped images of the Western blots are shown in **Figure S1**.

### **Nanocolloids/MTM confocal imaging**

Synthesized nanocolloids were tagged by adding 1% (v/v) of headgroup Cy5 labelled PC (850483C, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) to the membrane component mixture. After an *in vitro* treatment, MTM and labelled PLGA polymeric micelles were observed by confocal microscopy using Leica TCS-SP8X microscope (Photon Microscopy and Image Processing Unit, University of Oviedo). MTM detection was performed at 395/535 nm excitation/emission pair and Cy5 tagged nanoparticles at 649/666 nm.

## **RESULTS**

### **Nanocolloids characterization**

Table 1 summarizes mean sizes, PDI and EE values of both PLGA polymeric micelles and transferosome NVs. The sizes obtained by DLS were in the range of 210–267 nm for the PLGA polymeric micelles, which is an indication that all formulations present an appropriate size with a narrow PDI between 0.083 and 0.137. It is important to point out that the size measured by DLS corresponds to the hydrodynamic diameter which is normally larger than the one observed under TEM due to the double layer of ions and counterions that surround the nanocolloids in solution. TEM micrographs (**Figure 1A**) revealed sizes in the range of 100–150 nm. It was also observed that EE was higher in PLGA1 (S60:Cho) polymeric micelles (87%), formulated using cholesterol and without PC. This is in line with previous studies showing that cholesterol at low concentrations can increase EE [40].

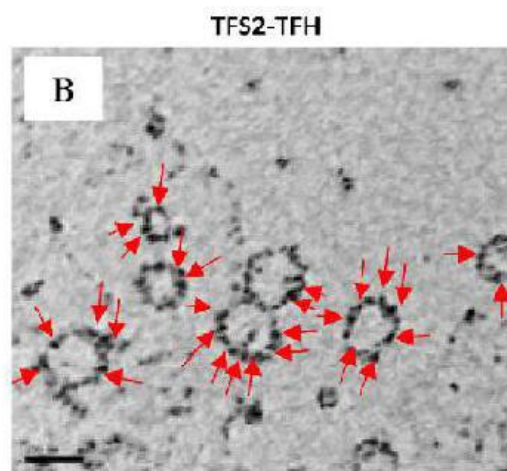
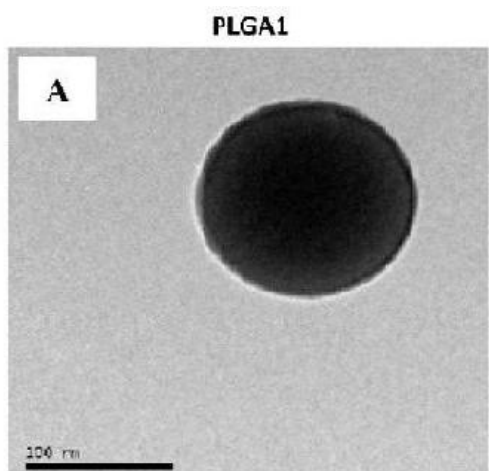
Transfersomes include the presence of both phospholipids and surfactants, sharing the properties of both types of systems. For the TFS formulations, the amount of membrane compounds added to the organic phase was optimized using PC, Span<sup>®</sup> 60, Tween<sup>®</sup> 20 and Cho membrane components. This formulation was used since it is one of the most common formulations studied in previous works [41–43]. Cho is commonly used as a membrane stabilizer for NV preparation to improve stability, membrane elasticity and EE.

However, cholesterol slightly increases vesicle size. It has also been reported that Cho plays an important role in niosome formulation when hydrophilic surfactants (as is the case of Tween<sup>®</sup> 20) are used as the main membrane compounds [41]. The sizes obtained by DLS were in the range of 97–133 nm, with similar sizes observed in TFS–TFH and TFS–EIM nanoparticles. PDI values were relatively low for TFS–EIM formulations while TFS–TFH particles showed a broader size distribution (PDI values between 0.37 and 0.40), which is consistent with the literature when this method is used [44]. TEM micrographs were in good agreement with the sizes reported by DLS for all TFS formulations (**Figure 1B**). EE values were similar for both methods of transfersome preparation and varied from 50% to 58%. Interestingly, MTM accumulated in the membrane bilayer of the TFS2–TFH nanoparticles, thus indicating that MTM has been entrapped in the lipophilic region of these NVs. (**Figure 1B**). This finding was in good agreement with the previous results reporting that hydrophilic molecules could interact with the hydrophilic portion of the membrane compounds at the NVs/water interface of encapsulating NVs when they were prepared by the TFH method [44].

For the subsequent testing of the cytotoxic activity of encapsulated MTM in sarcoma cells, we chose PLGA1 formulation, since it represents the polymeric micelles with the highest EE percentage and an adequate size. Regarding transfersome particles, given the similarity of sizes and EE obtained by both methods, TFS2-TFH and TFS4-TFH formulations were selected for further testing due to the great advantage this method offers, since it allows the preparation of a rather smaller volume of samples compared to the EIM one. The MTM concentration achieved in nanoparticles ranged from 443 to 547  $\mu\text{g/mL}$  for PLGA1, from 365 to 463  $\mu\text{g/mL}$  for TFS2–TFH, and from 433 to 579  $\mu\text{g/mL}$  for TFS4–TFH. These concentrations allow the treatment of pre-clinical models with doses above the maximum tolerated dose described for MTM (2 mg/Kg).

**Table 1:** PLGA polymeric micelles and transfersomes size (nm) in terms of Z average, intensity and number, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE).

	Formulation	Z-average Size (nm)	PDI	EE (%)
PLGA polymeric micelles	PLGA1 S60:Cho (1:0.5)	216 ± 26	0.101 ± 0.039	87 ± 15
	PLGA2 S60	267 ± 57	0.137 ± 0.02	82.5 ± 4.0
	PLGA3 PC	210 ± 5	0.084 ± 0.02	63.8 ± 12.3
	PLGA4 S60:PC (1:1)	221 ± 2	0.083 ± 0.02	76.4 ± 14.5
TFS-EIM	TFS1-EIM PC:S60:20:Cho (1:0.5:0.5:0.5)	115 ± 9	0.240 ± 0.018	58 ± 15
	TFS2-EIM PC:S60:20:Cho (1:1.5:1.5:1)	126 ± 4	0.246 ± 0.004	52 ± 18
	TFS3-EIM PC:S60:T20:Cho (3:3:3:1)	117 ± 5	0.235 ± 0.021	51 ± 10
	TFS4-EIM PC:S60:T20:Cho (1.5:1:0.5:1)	126 ± 3	0.244 ± 0.005	50 ± 11
TFS-TFH	TFS1-TFH PC:S60:20:Cho (1:0.5:0.5:0.5)	107 ± 4	0.400 ± 0.008	52 ± 14
	TFS2-TFH PC:S60:20:Cho (1:1,5:1,5:1)	127 ± 29	0.382 ± 0.074	50 ± 16
	TFS3-TFH PC:S60:T20:Cho (3:3:3:1)	97 ± 7	0.388 ± 0.053	56 ± 4
	TFS4-TFH PC:S60:20:Cho (1.5:1:0.5:1)	133 ± 39	0.366 ± 0.074	52 ± 11





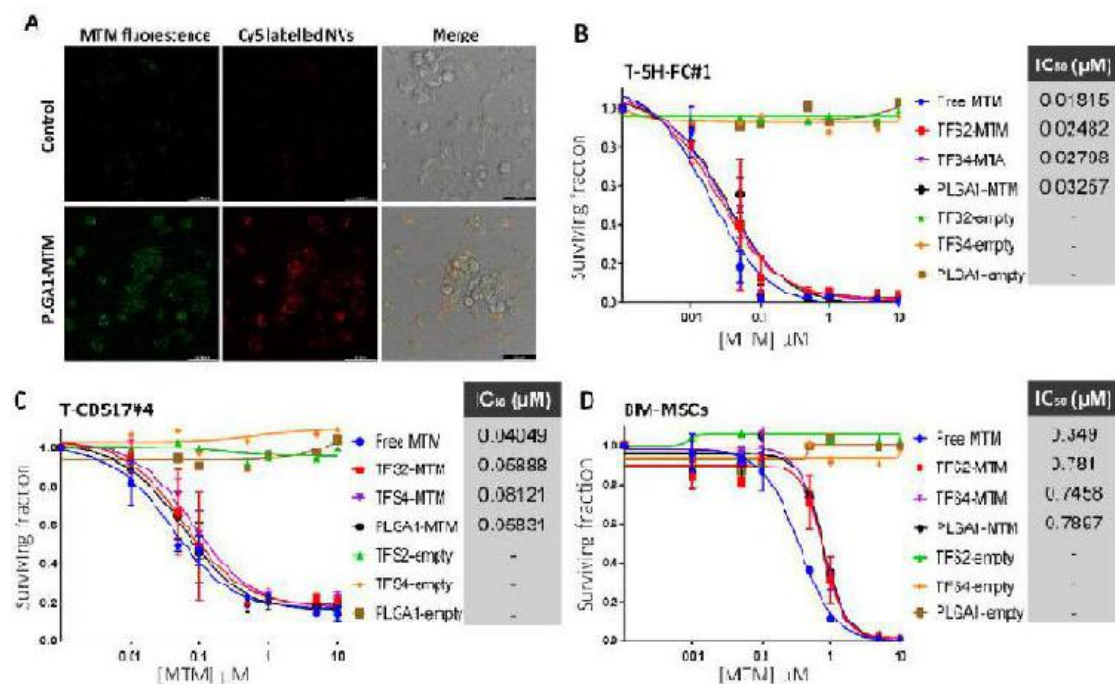
**Figure 1:** TEM micrographs of PLGA polymeric micelles and transfersomes containing mithramycin (MTM): (A) PLGA polymeric micelles prepared with Span<sup>®</sup> 60:Cholesterol (1:0.5)(PLGA1) by the solvent evaporation method containing MTM; (B) transfersomes formulated with PC:S60:20:Cho (1:1.5:1.5:1) prepared by the TFH method (TFS2-TFH) containing MTM. Red arrows indicate the presence of MTM in the membrane bilayer of transfersomes. Scale bar: 100 nm.

### **Free and encapsulated MTM shows similar cytotoxic effect in sarcoma cells.**

To study the ability of encapsulated MTM to target sarcoma cells, we first prepared MTM-loaded PLGA1 polymeric micelles including the headgroup Cy5 labelled PC and detected both MTM- (535 nm) and Cy5-emitted fluorescence (666 nm) by confocal microscopy. After the two-hour treatment of the liposarcoma model, T-5H-FC#1 cells with MTM-loaded PLGA nanoparticles we observed both types of fluorescence in most cells, thus indicating that nanoparticles can efficiently enter and release MTM inside sarcoma cells (**Figure 2A**).

Then, we compared the cytotoxic effect induced by free MTM and MTM loaded in PLGA1 (PLGA1-MTM), TFS2-TFH (TFS2-MTM), and TFS4-TFH (TFS4-MTM) nanoparticles in sarcomas cells. In these experiments, we found that MTM encapsulation does not affect its anti-tumor activity. Thus, T-5H-FC#1 liposarcoma cells ( $IC_{50} \approx 18-32$  nM) and T-CDS17#4 chondrosarcoma cells ( $IC_{50} \approx 40-81$  nM) were both sensitive to the nanomolar concentrations of all assayed MTM formulations (**Figure 2B,C**).

The anti-proliferative activity of free MTM in the primary cultures of non-transformed human BM-MSCs ( $IC_{50} = 350$  nM) is 10–20 lower than that observed in T-5H-FC#1 cells, originally derived from transformed BM-MSCs. Interestingly, MTM encapsulation in any of the assayed nano-formulations was able to reduce two times the anti-proliferative activity of free MTM in healthy BM-MSCs ( $IC_{50} \approx 745-790$  nM) (**Figure 2D**). In all cases, empty nanoparticles do not show any cytotoxic effect in both neoplastic or healthy cells at equivalent concentrations of MTM-loaded nanoparticles (**Figure 2B–D**).



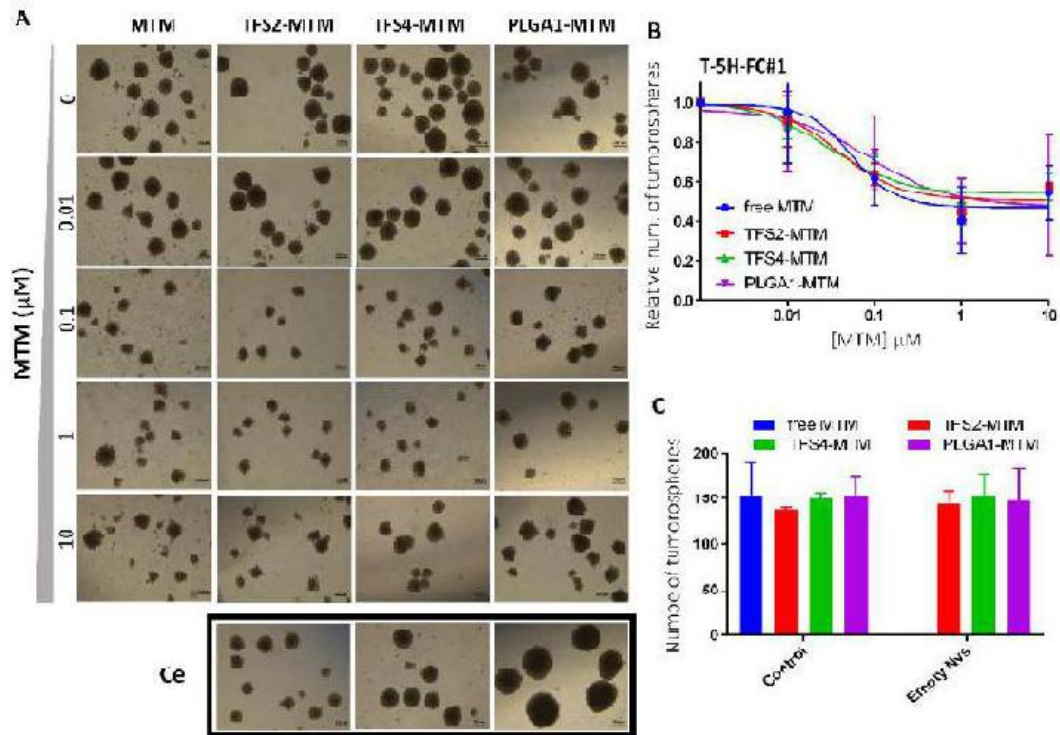
**Figure 2:** Anti-proliferative effect of the free MTM and nano-encapsulated MTM in sarcoma cells and hBM-MSCs: (A) confocal microscopy detection of fluorescence emitted by MTM (green fluorescence; left panels) and Cy5 (red fluorescence; middle panels) in T-5H-FC#1 cells treated with DMSO (control) or 1 μM MTM loaded in Cy5-labelled NVs-C for 2 h. Bright field images merged with green and red fluorescence emissions are also shown (right panels). Bar scale = 57.9 μm. (B–D) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of the myxoid liposarcoma model T-5H-FC#1 (B); the patient-derived chondrosarcoma cell line T-CDS17#4; (C) or a culture of non-transformed hBM-MSCs (D) with increasing concentrations of MTM for 72 h. The effect of equivalent amounts of empty nanoparticles are shown. IC<sub>50</sub> values for each treatment are indicated. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

### Nano-encapsulated MTM targets cancer stem cells (CSCs) subpopulations in sarcoma.

Cancer stem cell (CSC) subpopulations are thought to be responsible for tumor maintenance, being directly associated with invasion and metastatic dissemination [45]. Relevantly, MTM has demonstrated its potential to eliminate CSC subpopulations in different types of cancer [12,14,15,17]. CSC-enriched cell culture can be obtained by growing cells as floating 3D tumorspheres [34]. Therefore, we tested the ability of the different MTM formulations to target CSCs by analyzing their anti-proliferative effect in tumorsphere cultures.

Using this 3D model, we find that both free MTM and all assayed MTM nano-delivery systems are equally able to decrease the number and the size of T-5H-FC#1 tumorspheres

(Figure 3A,B). Furthermore, empty nanoparticles do not induce any cytotoxic effect against CSC-enriched cultures (Figure 3C).



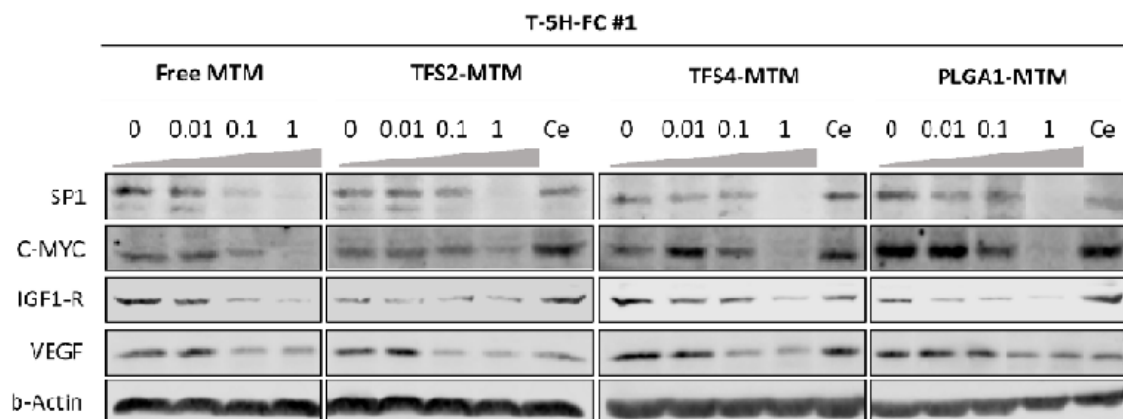
**Figure 3:** Effect of free and nano-encapsulated MTM in CSC-enriched 3D sarcoma cell cultures. (A) Cells were plated at low density in tumorsphere medium and left to form tumorspheres for 10 days before treating them for 72 h with increasing concentrations of MTM. Treatments with a number of empty nanoparticles corresponding to 10 μM (Ce) were also included. Scale bars = 250 μm. (B,C) Quantification of the spheres (represented as % of control) remaining after the treatment with MTM-loaded nanoparticles; (B) or with empty nanoparticles (C). Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

### Free and MTM loaded nanoparticles inhibit SP1 pathway similarly.

The anti-tumor activity of MTM relies on its capacity to bind GC-rich DNA regions and thus inhibit the gene expression mediated by pro-oncogenic transcription factors such as SP1 [5,46,47]. Therefore, we characterized the ability of the different MTM formulations to repress at the protein level the expression of SP1 and a panel SP1 downstream targets, such as C-MYC, IGF1-R and VEGF [48]. We find that both free and encapsulated MTM induce an efficient dose–response-dependent repression of all analyzed targets in T-5H- FC#1 cells (Figure 4). An MTM concentration of 1 μM was able to almost completely inhibit the

expression of all targets after 24 h of treatment. Moreover, no effect was observed after the treatment with empty nanoparticles (Figure 4).

These results confirmed that MTM encapsulated in polymeric nanoparticles and transfersomes mimic the ability of free MTM to inhibit the expression of important pro-tumor factors in sarcoma cells.



**Figure 4:** Inhibition of SP1 signaling by free and nano-encapsulated MTM. Western blotting analyses of SP1 and several SP1 downstream targets in T-5H-FC#1 cells treated with the indicated concentrations of the different MTM formulations for 24 h. A treatment with empty nanoparticles (Ce) at a concentration equivalent to the higher encapsulated MTM dosage was also included. The expression of  $\beta$ -actin was used as the loading control.

## DISCUSSION

MTM is a natural antibiotic approved by the FDA for the treatment of hypercalcemia [49]. This drug was also evaluated in the past for the treatment of several leukemias and solid tumors. Indeed, MTM demonstrated good anti-tumor responses in patients with testicular carcinoma, glioblastoma or Ewing sarcoma [6,50,51]. However, the appearance of severe systemic toxicities, in combination with the development of other successful and less toxic treatment regimens has limited the clinical use of MTM [7,8,50,52]. More recently, the discovery of new findings regarding the ability of MTM to block the signaling mediated by pro-oncogenic factors, such as SP1, EWS-FLI1, or SMARCB1-deficient SWI/SNF chromatin remodeling complexes, has renewed interest in this drug [5,6,9,46,47,53].

To clinically exploit these interesting anti-tumor properties of mithramycin while managing its adverse effects, different strategies have been developed. First, the development of second-generation mithramycin analogs, such as EC-8042, which show a similar efficacy in inhibiting SP1-mediated transcription activity and anti-stemness potential but much less toxicity, open the possibility of using these compounds in the clinic [16,54]. Additionally, according to newly described mechanisms of action of MTM, drug combinations with synergistic activity in different tumor types have been reported. Thus, recent studies have found that the combination of MTM with CDK9 inhibitors or the semisynthetic taxane cabazitaxel resulted in improved anti-tumor activity and/or limited MTM-toxicity in Ewing sarcoma [10] and B-cell acute lymphoblastic leukemia [11], respectively. Finally, MTM encapsulation in different delivery systems is being evaluated as a way to improve its clinical utility. A few studies previously reported protocols to encapsulate MTM in Ca<sup>2+</sup>-loaded large unilamellar vesicles (LUVs) [28], in PLGA nanoparticles through single-emulsion solvent evaporation or nanoprecipitation techniques [25,26], and other types of polymeric micelles using microfluidic technology [27]. In addition, several MTM analogues have also been formulated in cross-linked micelles [55]. Here, we used new refined methods to synthesize controlled size PLGA polymeric micelles and transfersomes that allow the direct encapsulation of MTM. For the synthesis of PLGA micelles, we tested different nanoparticle formulations by modifying the main amphiphilic component of the micelle, i.e., using both non-ionic surfactant, phospholipid, or a combination of both. In addition, we also studied the effect of adding a membrane stabilizer (cholesterol) following the method (emulsion/solvent evaporation) reported by Wang et al. to encapsulate doxorubicin [56]. This could affect the interactions between the polar heads or hydrophobic chains with the PLGA and MTM and therefore affect the final colloidal stability, size, PDI and EE. The ability of our PLGA micelles to entrap MTM (up to 87%) were higher than that reported by Wang et al. for doxorubicin encapsulation (44%) using the same method with soybean lecithin as the main micelle component [56]. This method was also used by Liu et al. to encapsulate MTM in poly-ethylene glycol-coated PLGA nanoparticles [26]. The formulations used by these authors yielded smaller nanoparticles (25 nm) with a lower EE of 29.5%. In addition, MTM was encapsulated in by Cohen-Sela et al. in PLGA nanoparticles using different approaches. These authors show that a modified emulsion/solvent method formed nanoparticles of 110 nm with EE values of 41%, while a

double emulsion solvent diffusion method or a nanoprecipitation technique produced particles of 130–160 nm and a higher EE of 80%, similar to that measured in our PLGA micelles [25]. Capretto et al. demonstrated that MTM can be efficiently encapsulated in polymeric micelles based on Pluronic® block copolymers by a new microfluidic approach. In this case, the sizes obtained were smaller, as expected regarding the microfluidic method used, being in the range of 60–90 nm, with a percentage of drug incorporated in the polymeric micelles ranging from 55% to 92% but with a total concentration of MTM encapsulated from 0.5 to 40 µg/mL [27].

Similar to polymeric nanoparticles, the size of lipidic NVs is also governed by their composition and preparation method. Previous studies by our group aimed at optimizing the encapsulation of compounds of various natures in different types of NVs (niosomes, liposomes and transfersomes) showed that both EIM and TFH methods were capable of producing transfersomes with a favorable size range (100–200 nm) and high EE values [41,57]. Notably, TFH has demonstrated its potential to efficiently entrap difficult-to-encapsulate hydrophilic drugs, as is the case with MTM [44]. The only previous attempt to encapsulate MTM in lipid nanoparticles was reported in 1997 by Frézard et al. These authors showed that MTM can be indirectly encapsulated within LUVs, made from dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol, only when the liposomes containing Ca<sup>2+</sup> and were resuspended in a Ca<sup>2+</sup>-free medium. Using this formulation, MTM and Ca<sup>2+</sup> formed a high affinity complex inside the inner aqueous core of the liposomes, leading to reach EE values up to 60% [28]. In our study, we produced transfersomes presenting similar EE values and also with the advantage that the preparation methods used here, both EIM and TFH, which allows direct encapsulation, thus facilitating subsequent applications as nanocarriers for cancer cell treatment.

Here, we used our MTM nano-delivery systems to assay its potential to target sarcoma cells. We showed that all assayed MTM nano-formulations retain the efficient anti-tumor activity of free MTM, both in a cell-of-origin model of sarcoma-initiating cells and a patient-derived model of chondrosarcoma. Interestingly, MTM-nanoparticles resulted as less toxic than free MTM to normal BM-MSCs. Therefore, it may be speculated that these nanocarriers have the potential to increase the therapeutic window of MTM. The exact mechanism by which nano-encapsulated MTMs show a safer profile in healthy cells *in vitro* is yet to be clarified, but it may be due to the differential effect of the sustained drug release in tumoral and non-tumoral

cells, as suggested for other drugs such as doxorubicin [58]. In any case, future *in vivo* analyses should be performed to confirm that MTM encapsulation is able to reduce the systemic toxicity of this drug, making possible the safe administration of concentrations capable of inhibiting tumor growth *in vivo*.

The cytotoxic effect of nanocarrier-delivered MTM is accompanied by an efficient ability to inhibit the expression of SP1 and other well-known SP1 downstream targets. This transcription factor has been reported to control tumor growth and promote drug resistance both in soft tissue sarcoma [59,60] and bone sarcomas [61]. Relevantly, we previously showed that the inhibition of SP1 with the mithramycin analog EC-8042 was able to efficiently inhibit the growth of our myxoid liposarcoma model [13,16]. Among the SP1 downstream targets that we found to be efficiently downregulated by MTM there are some of the genes most commonly amplified/upregulated in sarcomas, such as C-MYC, VEGF or IGF1R [62–65]. Several targeted therapies against most of these factors have been investigated and used for sarcoma treatment in recent years. For instance, anti-VEGF treatments, such as lapatinib or pazopanib, have been used for the treatment of leiomyosarcoma and other soft tissue sarcomas [1,66]. However, although some improvements have been found in specific cases, these targeted therapies have not demonstrated a higher efficacy as first-line treatments than standard chemotherapy in most cases of sarcoma. We speculate that treatments such as nano-delivered MTM, which are able to simultaneously inhibit several well-known driver oncogenes in sarcoma, may have a higher impact on the patient's outcome.

Another recently reported interesting property of MTM and MTM analogues is their ability to target the tumorigenic and invasive CSC subpopulations in different tumor types. Thus, MTM was able to downregulate the expression of genes associated with the CSC phenotype and target CSC subpopulations in glioblastoma [15], medulloblastoma [17], lung cancer [12] and colon cancer [14]. In a similar way, we showed that EC-8042 was able to inhibit the expression of a panel of CSC markers and demonstrated a higher ability to target CSCs *in vivo* than other chemotherapeutics drugs in sarcoma cells [13,16]. Here, we show that nano-encapsulated MTM is able to reduce the viability of CSC-enriched tumorspheres, hence confirming that these formulations keep the anti-stemness potential of free MTM and MTM analogues.

## **CONCLUSIONS**

Overall, we provide new formulations for the efficient nano-encapsulation of MTM. These MTM-delivery systems retain the anti-tumor and anti-stemness potential of free MTM in sarcoma cells, therefore suggesting that they may constitute a safer MTM-delivering alternative to be explored for future clinical uses.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceptualization, R.R., M.M., M.C.B-L and G.G.; methodology, O.E., P.S., C.R., V.R. and D.M.; formal analysis, O.E., G.G., M.C.B-L., M.M., and R.R.; investigation, O.E., P.S., C.R., V.R. and D.M.; resources; F.M.; data curation, O.E., G.G., M.C.B-L., M.M., and R.R.; writing—original draft preparation, M.M. and R.R.; writing—review and editing, R.R., M.M., M.C.B-L, G.G. and F.M.; supervision, R.R., M.M., M.C.B-L and G.G.; funding acquisition, R.R and M.C.B-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## **INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT**

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of the Principado de Asturias (protocol code 46/16 approved on April 8, 2016 and protocol code 255/19 approved on February 28, 2020).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was funded by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) /Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) [Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) under Grants MAT2017-84959-C2-1-R to MCBL and PID2019-106666RB-I00 and SAF2016-75286-R to R.R and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Spain) through the Consorcio CIBERONC (CB16/12/00390)]. This study was also financed by the Consejería de Economía y Empleo del Principado de Asturias (Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017), under the Grants IDI/2018/000185 and IDI/2018/155 and the Severo Ochoa predoctoral fellowship (BP-17-108) to O.E. Support from the European Regional Development Fund (ERDF) is gratefully acknowledged. This study was also funded by Europa Investigación (ref: EUIN2019-103338).



## REFERENCES

1. Grunewald, T.G.; Alonso, M.; Avnet, S.; Banito, A.; Burdach, S.; Cidre-Aranaz, F.; Di Pompo, G.; Distel, M.; Dorado-Garcia, H.; Garcia-Castro, J. et al.; Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *EMBO Mol Med* 2020, 12, e11131. doi: 10.15252/emmm.201911131.
2. Casali, P.G.; Abecassis, N.; Aro, H.T.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bielack, S.; Bonvalot, S.; Boukovinas, I.; Bovee, J.; Brodowicz, T. et al.; Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-  
EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018, 29, iv51-iv67. doi: 10.1093/annonc/mdy096.
3. Casali, P.G.; Bielack, S.; Abecassis, N.; Aro, H.T.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bonvalot, S.; Boukovinas, I.; Bovee, J.; Brennan, B. et al.; Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-  
EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018, 29, iv79-iv95. doi: 10.1093/annonc/mdy310.
4. Lombó, F.; Menéndez, N.; Salas, J.A.; Méndez, C.; The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 73, 1-14. doi: 10.1007/s00253-006-0511-6.
5. Miller, D.M.; Polansky, D.A.; Thomas, S.D.; Ray, R.; Campbell, V.W.; Sanchez, J.; Koller, C.A.; Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA. *Am J Med Sci* 1987, 294, 388-394. doi: 10.1097/00000441-198711000-00015.
6. Grohar, P.J.; Woldemichael, G.M.; Griffin, L.B.; Mendoza, A.; Chen, Q.R.; Yeung, C.; Currier, D.G.; Davis, S.; Khanna, C.; Khan, J. et al.; Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst* 2011, 103, 962-978. doi: 10.1093/jnci/djr156.
7. Green, L.; Donehower, R.C.; Hepatic toxicity of low doses of mithramycin in hypercalcemia. *Cancer Treat Rep* 1984, 68, 1379-1381.
8. Monto, R.W.; Talley, R.W.; Caldwell, M.J.; Levin, W.C.; Guest, M.M.; Observations on the mechanism of hemorrhagic toxicity in mithramycin (NSC 24559) therapy. *Cancer Res* 1969, 29, 697-704.
9. Bailey, K.; Cost, C.; Davis, I.; Glade-Bender, J.; Grohar, P.; Houghton, P.; Isakoff, M.; Stewart, E.; Laack, N.; Yustein, J. et al.; Emerging novel agents for patients with advanced Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group (COG) New

- Agents for Ewing Sarcoma Task Force. *F1000Res* 2019, 8. doi: 10.12688/f1000research.18139.1.
10. Flores, G.; Everett, J.H.; Boguslawski, E.A.; Oswald, B.M.; Madaj, Z.B.; Beddows, I.; Dikalov, S.; Adams, M.; Klumpp-Thomas, C.A.; Kitchen-Goosen, S.M. et al.; CDK9 Blockade Exploits Context-dependent Transcriptional Changes to Improve Activity and Limit Toxicity of Mithramycin for Ewing Sarcoma. *Mol Cancer Ther* 2020, 19, 1183-1196. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0775.
  11. Nair, R.R.; Piktel, D.; Geldenhuys, W.J.; Gibson, L.F.; Combination of cabazitaxel and plicamycin induces cell death in drug resistant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2018, 72, 59-66. doi: 10.1016/j.leukres.2018.08.002.
  12. Dong, P.; Xiong, Y.; Hanley, S.J.B.; Yue, J.; Watari, H.; Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. *J Exp Clin Cancer Res* 2017, 36, 150. doi: 10.1186/s13046-017-0617-y.
  13. Menendez, S.T.; Rey, V.; Martinez-Cruzado, L.; Gonzalez, M.V.; Morales-Molina, A.; Santos, L.; Blanco, V.; Alvarez, C.; Estupinan, O.; Allonca, E. et al.; SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers (Basel)* 2020, 12. doi: 10.3390/cancers12040964.
  14. Quarni, W.; Dutta, R.; Green, R.; Katiri, S.; Patel, B.; Mohapatra, S.S.; Mohapatra, S.; Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells. *Sci Rep* 2019, 9, 15202. doi: 10.1038/s41598-019-50917-3.
  15. Singh, D.K.; Kollipara, R.K.; Vemireddy, V.; Yang, X.L.; Sun, Y.; Regmi, N.; Klingler, S.; Hatanpaa, K.J.; Raisanen, J.; Cho, S.K. et al.; Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma. *Cell Rep* 2017, 18, 961-976. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.064.
  16. Tornin, J.; Martinez-Cruzado, L.; Santos, L.; Rodriguez, A.; Nunez, L.E.; Oro, P.; Hermosilla, M.A.; Allonca, E.; Fernandez-Garcia, M.T.; Astudillo, A. et al.; Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma. *Oncotarget* 2016, 7, 30935-30950. doi: 10.18632/oncotarget.8817.
  17. Vanner, R.J.; Remke, M.; Gallo, M.; Selvadurai, H.J.; Coutinho, F.; Lee, L.; Kushida, M.; Head, R.; Morrissy, S.; Zhu, X. et al.; Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical

- growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell* 2014, 26, 33-47. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.005.
18. Banik, B.L.; Fattahi, P.; Brown, J.L.; Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2016, 8, 271-299. doi: 10.1002/wnan.1364.
  19. Awasthi, R.; Roseblade, A.; Hansbro, P.M.; Rathbone, M.J.; Dua, K.; Bebawy, M.; Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. *Curr Drug Targets* 2018, 19, 1696-1709. doi: 10.2174/1389450119666180326122831.
  20. Bahrami, B.; Hojjat-Farsangi, M.; Mohammadi, H.; Anvari, E.; Ghalamfarsa, G.; Yousefi, M.; Jadidi-Niaragh, F.; Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol Lett* 2017, 190, 64-83. doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.015.
  21. Golombek, S.K.; May, J.N.; Theek, B.; Appold, L.; Drude, N.; Kiessling, F.; Lammers, T.; Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2018, 130, 17-38. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
  22. Asghari, F.; Khademi, R.; Esmaeili Ranjbar, F.; Veisi Malekshahi, Z.; Faridi Majidi, R.; Application of Nanotechnology in Targeting of Cancer Stem Cells: A Review. *International journal of stem cells* 2019, 12, 227-239. doi: 10.15283/ijsc19006.
  23. Kang, M.H.; Wang, J.; Makena, M.R.; Lee, J.S.; Paz, N.; Hall, C.P.; Song, M.M.; Calderon, R.I.; Cruz, R.E.; Hindle, A. et al.; Activity of MM-398, nanoliposomal irinotecan (nal-IRI), in Ewing's family tumor xenografts is associated with high exposure of tumor to drug and high SLFN11 expression. *Clin Cancer Res* 2015, 21, 1139-1150. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-14-1882.
  24. Porche, D.J.; Liposomal doxorubicin (Doxil). *J Assoc Nurses AIDS Care* 1996, 7, 55-59. doi: 10.1016/s1055-3290(96)80016-1.
  25. Cohen-Sela, E.; Teitlboim, S.; Chorny, M.; Koroukhov, N.; Danenberg, H.D.; Gao, J.; Golomb, G.; Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in PLGA nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity. *J Pharm Sci* 2009, 98, 1452-1462. doi: 10.1002/jps.21527.
  26. Liu, X.J.; Li, L.; Liu, X.J.; Li, Y.; Zhao, C.Y.; Wang, R.Q.; Zhen, Y.S.; Mithramycin-loaded mPEG-PLGA nanoparticles exert potent antitumor efficacy against pancreatic carcinoma. *Int J Nanomedicine* 2017, 12, 5255-5269. doi: 10.2147/IJN.S139507.

27. Capretto, L.; Mazzitelli, S.; Brognara, E.; Lampronti, I.; Carugo, D.; Hill, M.; Zhang, X.; Gambari, R.; Nastruzzi, C.; Mithramycin encapsulated in polymeric micelles by microfluidic technology as novel therapeutic protocol for beta-thalassemia. *Int J Nanomedicine* 2012, 7, 307-324. doi: 10.2147/IJN.S25657.
28. Frézard, F.; Garnier-Suillerot, A.; Demicheli, C.; Encapsulation of Mithramycin in Liposomes in Response to a Transmembrane Gradient of Calcium Ions. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry* 1997, 28, 51-62. doi: 10.1023/A:1007985811673.
29. El-Hammadi, M.M.; Arias, J.L.; An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014-2018). *Expert Opin Ther Pat* 2019, 29, 891-907. doi: 10.1080/13543776.2019.1679767.
30. Garg, V.; Singh, H.; Bimbrawh, S.; Singh, S.K.; Gulati, M.; Vaidya, Y.; Kaur, P.; Ethosomes and Transfersomes: Principles, Perspectives and Practices. *Curr Drug Deliv* 2017, 14, 613-633. doi: 10.2174/1567201813666160520114436.
31. Devaraj, G.N.; Parakh, S.R.; Devraj, R.; Apte, S.S.; Rao, B.R.; Rambhau, D.; Release Studies on Niosomes Containing Fatty Alcohols as Bilayer Stabilizers Instead of Cholesterol. *Journal of Colloid and Interface Science* 2002, 251, 360-365. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.2002.8399>.
32. Rodriguez, R.; Rosu-Myles, M.; Aráuzo-Bravo, M.; Horrillo, A.; Pan, Q.; Gonzalez-Rey, E.; Delgado, M.; Menendez, P.; Human bone marrow stromal cells lose immunosuppressive and anti-inflammatory properties upon oncogenic transformation. *Stem cell reports* 2014, 3, 606-619. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.005.
33. Rodriguez, R.; Tornin, J.; Suarez, C.; Astudillo, A.; Rubio, R.; Yauk, C.; Williams, A.; Rosu-Myles, M.; Funes, J.M.; Boshoff, C. et al.; Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem Cells* 2013, 31, 2061-2072. doi: 10.1002/stem.1472.
34. Martinez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Santos, L.; Rodriguez, A.; Garcia-Castro, J.; Moris, F.; Rodriguez, R.; Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations. *Sci Rep* 2016, 6, 27878. doi: 10.1038/srep27878.
35. Rey, V.; Menendez, S.T.; Estupinan, O.; Rodriguez, A.; Santos, L.; Tornin, J.; Martinez-Cruzado, L.; Castillo, D.; Ordonez, G.R.; Costilla, S. et al.; New Chondrosarcoma Cell

- Lines with Preserved Stem Cell Properties to Study the Genomic Drift During *In vitro/In vivo* Growth. *J Clin Med* 2019, 8. doi: 10.3390/jcm8040455.
36. Novakova, R.; Nunez, L.E.; Homerova, D.; Knirschova, R.; Feckova, L.; Rezuchova, B.; Sevcikova, B.; Menendez, N.; Moris, F.; Cortes, J. et al.; Increased heterologous production of the antitumoral polyketide mithramycin A by engineered *Streptomyces lividans* TK24 strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018, 102, 857-869. doi: 10.1007/s00253-017-8642-5.
37. Tornin, J.; Hermida-Prado, F.; Padda, R.S.; Gonzalez, M.V.; Alvarez-Fernandez, C.; Rey, V.; Martinez-Cruzado, L.; Estupinan, O.; Menendez, S.T.; Fernandez-Nevado, L. et al.; FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway. *Neoplasia* 2018, 20, 44-56. doi: 10.1016/j.neo.2017.11.004.
38. Martinez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Rodriguez, A.; Santos, L.; Allonca, E.; Fernandez-Garcia, M.T.; Astudillo, A.; Garcia-Pedrero, J.M.; Rodriguez, R.; Trabectedin and Camptotecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models. *Neoplasia* 2017, 19, 460-470. doi: 10.1016/j.neo.2017.03.004.
39. Zuazua-Villar, P.; Rodriguez, R.; Gagou, M.E.; Eysers, P.A.; Meuth, M.; DNA replication stress in CHK1-depleted tumour cells triggers premature (S-phase) mitosis through inappropriate activation of Aurora kinase B. *Cell Death Dis* 2014, 5, e1253. doi: 10.1038/cddis.2014.231.
40. Mali, N.; Darandale, S.; Vavia, P.; Niosomes as a vesicular carrier for topical administration of minoxidil: formulation and *in vitro* assessment. *Drug Deliv Transl Res* 2013, 3, 587-592. doi: 10.1007/s13346-012-0083-1.
41. Estupiñan, O.R.; Garcia-Manrique, P.; Blanco-Lopez, M.d.C.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; Vitamin D3 Loaded Niosomes and Transfersomes Produced by Ethanol Injection Method: Identification of the Critical Preparation Step for Size Control. *Foods* 2020, 9, 1367.
42. Garcia-Manrique, P.; Gutierrez, G.; Matos, M.; Cristaldi, A.; Mosayyebi, A.; Carugo, D.; Zhang, X.; Blanco-Lopez, M.C.; Continuous flow production of size-controllable niosomes using a thermostatic microreactor. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019, 182, 110378. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110378.

43. Pando, D.; Matos, M.; Gutierrez, G.; Pazos, C.; Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015, 128, 398-404. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.037.
44. García-Manrique, P.; Machado, N.D.; Fernández, M.A.; Blanco-López, M.C.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2020, 186, 110711. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110711.
45. Abarrategi, A.; Tornin, J.; Martinez-Cruzado, L.; Hamilton, A.; Martinez-Campos, E.; Rodrigo, J.P.; Gonzalez, M.V.; Baldini, N.; Garcia-Castro, J.; Rodriguez, R.; Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int* 2016, 2016, 3631764. doi: 10.1155/2016/3631764.
46. Choi, E.S.; Nam, J.S.; Jung, J.Y.; Cho, N.P.; Cho, S.D.; Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer. *Sci Rep* 2014, 4, 7162. doi: 10.1038/srep07162.
47. Vizcaino, C.; Mansilla, S.; Portugal, J.; Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2015, 152, 111-124. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.008.
48. Beishline, K.; Azizkhan-Clifford, J.; Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J* 2015, 282, 224-258. doi: 10.1111/febs.13148.
49. Perlia, C.P.; Gubisch, N.J.; Wolter, J.; Edelberg, D.; Dederick, M.M.; Taylor, S.G., 3rd; Mithramycin treatment of hypercalcemia. *Cancer* 1970, 25, 389-394. doi: 10.1002/1097-0142(197002)25:2<389::aid-cnrcr2820250217>3.0.co;2-x.
50. Kennedy, B.J.; Torkelson, J.L.; Long-term follow-up of stage III testicular carcinoma treated with mithramycin (plicamycin). *Med Pediatr Oncol* 1995, 24, 327-328. doi: 10.1002/mpo.2950240511.
51. Kofman, S.; Perlia, C.P.; Economou, S.G.; Mithramycin in the treatment of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer* 1973, 31, 889-893. doi: 10.1002/1097-0142(197304)31:4<889::aid-cnrcr2820310419>3.0.co;2-h.
52. Grohar, P.J.; Glod, J.; Peer, C.J.; Sissung, T.M.; Arnaldez, F.I.; Long, L.; Figg, W.D.; Whitcomb, P.; Helman, L.J.; Widemann, B.C.; A phase I/II trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS-

- FLI1 fusion transcript. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017, 80, 645-652. doi: 10.1007/s00280-017-3382-x.
53. Chasse, M.H.; Johnson, B.K.; Boguslawski, E.A.; Sorensen, K.M.; Rosien, J.E.; Kang, M.H.; Reynolds, C.P.; Heo, L.; Madaj, Z.B.; Beddows, I. et al.; Mithramycin induces promoter reprogramming and differentiation of rhabdoid tumor. *EMBO Mol Med* 2020, e12640. doi: 10.15252/emmm.202012640.
54. Osgood, C.L.; Maloney, N.; Kidd, C.G.; Kitchen-Goosen, S.; Segars, L.; Gebregiorgis, M.; Woldemichael, G.M.; He, M.; Sankar, S.; Lessnick, S.L. et al.; Identification of Mithramycin Analogues with Improved Targeting of the EWS-FLI1 Transcription Factor. *Clin Cancer Res* 2016, 22, 4105-4118. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2624.
55. Scott, D.; Rohr, J.; Bae, Y.; Nanoparticulate formulations of mithramycin analogs for enhanced cytotoxicity. *Int J Nanomedicine* 2011, 6, 2757-2767. doi: 10.2147/IJN.S25427.
56. Wang, S.; Zhao, C.; Liu, P.; Wang, Z.; Ding, J.; Zhou, W.; Facile construction of dual-targeting delivery system by using lipid capped polymer nanoparticles for anti-glioma therapy. *RSC Advances* 2018, 8, 444-453. doi: 10.1039/C7RA12376K.
57. García-Manrique, P.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; Estupiñán, O.R.; Blanco-López, M.C.; Pazos, C.; Using Factorial Experimental Design To Prepare Size-Tuned Nanovesicles. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2016, 55, 9164-9175. doi: 10.1021/acs.iecr.6b01552.
58. Niza, E.; Castro-Osma, J.A.; Posadas, I.; Alonso-Moreno, C.; Bravo, I.; Garzon, A.; Canales-Vazquez, J.; Cena, V.; Lara-Sanchez, A.; Albaladejo, J. et al.; Assessment of doxorubicin delivery devices based on tailored bare polycaprolactone against glioblastoma. *Int J Pharm* 2019, 558, 110-119. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.079.
59. Chadalapaka, G.; Jutooru, I.; Sreevalsan, S.; Pathi, S.; Kim, K.; Chen, C.; Crose, L.; Linardic, C.; Safe, S.; Inhibition of rhabdomyosarcoma cell and tumor growth by targeting specificity protein (Sp) transcription factors. *Int J Cancer* 2013, 132, 795-806. doi: 10.1002/ijc.27730.
60. Lou, Z.; O'Reilly, S.; Liang, H.; Maher, V.M.; Sleight, S.D.; McCormick, J.J.; Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation. *Cancer Res* 2005, 65, 1007-1017.

61. Meng, Y.; Hao, D.; Huang, Y.; Jia, S.; Zhang, J.; He, X.; Sun, L.; Liu, D.; Positive feedback loop SP1/MIR17HG/miR-130a-3p promotes osteosarcoma proliferation and cisplatin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2020, 521, 739-745. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.180.
62. Alfranca, A.; Martinez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Abarrategi, A.; Amaral, T.; de Alava, E.; Menendez, P.; Garcia-Castro, J.; Rodriguez, R.; Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell Mol Life Sci* 2015, 72, 3097-3113. doi: 10.1007/s00018-015-1918-y.
63. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, e.d.s.c.; Cancer Genome Atlas Research, N.; Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* 2017, 171, 950-965 e928. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.014.
64. Kovac, M.; Blattmann, C.; Ribic, S.; Smida, J.; Mueller, N.S.; Engert, F.; Castro-Giner, F.; Weischenfeldt, J.; Kovacova, M.; Krieg, A. et al.; Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun* 2015, 6, 8940. doi: 10.1038/ncomms9940.
65. Sayles, L.C.; Breese, M.R.; Koehne, A.L.; Leung, S.G.; Lee, A.G.; Liu, H.Y.; Spillinger, A.; Shah, A.T.; Tanasa, B.; Straessler, K. et al.; Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Cancer Discov* 2019, 9, 46-63. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1152.
66. Harwood, J.L.; Alexander, J.H.; Mayerson, J.L.; Scharschmidt, T.J.; Targeted Chemotherapy in Bone and Soft-Tissue Sarcoma. *Orthop Clin North Am* 2015, 46, 587-608. doi: 10.1016/j.ocl.2015.06.011.



### 2.2.1. Artículo 3: Mithramycin delivery systems to develop effective therapies in sarcomas

#### MITHRAMYCIN DELIVERY SYSTEMS TO DEVELOP EFFECTIVE THERAPIES IN SARCOMAS

Óscar Estupiñán<sup>1,2,3#</sup>, Enrique Niza<sup>4,5#</sup>, Iván Bravo<sup>4,5</sup>, Verónica Rey<sup>1,2</sup>, Juan Tornín<sup>1,2</sup>, Borja Gallego<sup>1</sup>, Pilar Clemente-Casares<sup>6</sup>, Francisco Moris<sup>7</sup>, Alberto Ocaña<sup>3,8</sup>, Verónica Blanco-Lorenzo<sup>1,9</sup>, Mar Rodríguez-Santamaría<sup>1</sup>, Aitana Vallina-Álvarez<sup>2,9</sup>, M. Victoria González<sup>1,2,3,10</sup>, Aida Rodríguez<sup>1</sup>, Daniel Hermida-Merino<sup>11</sup>, Carlos Alonso-Moreno<sup>4,5\*</sup> and René Rodríguez<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n 33011 Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain. <sup>3</sup>CIBER en oncología (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain. <sup>4</sup>Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Unidad NanoCRIB, 02008 Albacete, Spain. <sup>5</sup>Universidad de Castilla-La Mancha. Facultad de Farmacia de Albacete, 02008 Albacete, Spain. <sup>6</sup>Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), UCLM, Albacete-02008, Spain. <sup>7</sup>EntreChem SL, 33011 Oviedo, Spain. <sup>8</sup>Experimental Therapeutics Unit, Hospital clínico San Carlos, IdISSC, 28040, Madrid, Spain. <sup>9</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain. <sup>10</sup>Departamento de Cirugía, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain. <sup>11</sup>Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO), DUBBLE@ESRF, Grenoble, 38000, France. #Both authors contributed equally

#### ABSTRACT

Sarcomas comprise a group of aggressive malignancies with very little treatment options beyond standard chemotherapy. Reposition of approved drugs represents an attractive approach to identify effective therapeutic compounds. One example is mithramycin (MTM), a natural antibiotic which has demonstrated a strong antitumour activity in several tumour types, including sarcomas. However, its widespread use in the clinic was limited by its poor toxicity profile.

In order to improve the therapeutic index of MTM, we have loaded MTM into newly developed nanocarrier formulations. First, polylactide (PLA) polymeric nanoparticles (NPs) were generated by nanoprecipitation. Also, liposomes (LIP) were prepared by ethanol injection and evaporation solvent method. Finally, MTM-loaded hydrogels (HG) were obtained by passive loading using a urea derivative non-peptidic hydrogelator. MTM-loaded

NPs and LIP display optimal hydrodynamic radii between 80 and 105 nm with a very low polydispersity index (PdI) and encapsulation efficiencies (EE) of 92 and 30%, respectively. All formulations show a high stability and different release rates ranging from a fast release in HG (100% after 30 min) to more sustained release from NPs (100% after 24h) and LIP (40% after 48 hours). *In vitro* assays confirmed that all assayed MTM formulations retain the cytotoxic, anti-invasive and anti-stemness potential of free MTM in models of myxoid liposarcoma, undifferentiated pleomorphic sarcoma and chondrosarcoma. In addition, whole genome transcriptomic analysis evidenced the ability of MTM, both free and encapsulated, to act as a multi-repressor of several tumour-promoting pathways at once. Importantly, the treatment of mice bearing sarcoma xenografts showed that encapsulated MTM exhibited enhanced therapeutic effects and was better tolerated than free MTM.

Overall, these novel formulations may represent an efficient and safer MTM-delivering alternative for sarcoma treatment.

**Keywords:** mithramycin, sarcoma, soft tissue sarcoma, chondrosarcoma, polymeric nanoparticles, polylactide, small unilamellar vesicles liposomes, hydrogels, cancer stem cells.

**Abbreviations:** CSC: Cancer Stem Cells; CFU: Colony Formation Unit; mCMV: Cytomegalovirus; DEG: Differentially Expressed Genes; DLS: Dynamic Light Scattering; EE: Encapsulation Efficiency; FC: FUS-CHOP; GSEA: Gene Set Enrichment Analysis; GL: Glucono- $\delta$ -lactone;  $R_H$ : Hydrodynamic Radius; HG: Hydrogel; LIP: Liposomes; LE: Loading Efficiency; FOS: L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine; MSCs: Mesenchymal Stromal/stem cells; MCFT: Miglyol-812; MTM: Mithramycin; NPs: Nanoparticles; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); PLA: Poly(rac-lactide) / polylactide; PVA: Poly(vinyl alcohol); PdI: Polydispersity index; PC: Principal Component; SEM: Scanning Electron Microscopy; SORE6: SOX2/OCT4 Response Element; TEM: Transmission electron microscopy.

**Availability of data and materials:** The RNA seq datasets generated during the study are available in the GEO-NCBI repository (Reference: GSE161616; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE161616>).

**Conflict of interests:** FM is employee and reports ownership of stock in of EntreChem SL. All other authors declare they have no competing interests.

**Grant Sponsor:** This work was supported by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) [MICINN/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (grants PID2019-106666RB-I00 and SAF2016-75286-R to R.R.), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Spain (Grant Nos. CTQ2017-84131-R and CTQ2016-81797-REDC Programa Redes Consolidar) and ISC III/FEDER (Consortio CIBERONC - CB16/12/00390)] and the Plan de Ciencia Tecnología e Innovación del Principado de Asturias/FEDER [grant IDI/2018/155 and Severo Ochoa predoctoral fellowship (BP-17-108 to O.E.)]. Enrique Niza acknowledges the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha for the Fellowship.

**Correspondence to:**

Carlos Alonso-Moreno, PhD. Unidad nanoCRIB, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, 02008 Albacete, Spain. E-mail: Carlos.amoreno@uclm.es. Phone number: +34967599200

Rene Rodriguez, PhD. Sarcomas and Experimental Therapeutics Lab., Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Av. de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain. Phone: +34985101399. Email: [rene.rodriguez@ispasturias.es](mailto:rene.rodriguez@ispasturias.es)

## INTRODUCTION

Mithramycin (MTM), also called plycamycin is an antitumoural antibiotic natural product approved for the treatment of hypercalcemia [1] and which has also demonstrated good antitumour responses in the treatment of testicular cancer, glioblastoma or Ewing sarcoma [2-4]. Its mechanism of action is based on the binding to GC-rich sequences in DNA which, in turn, prevent the binding of transcription factors of the SP family in gene promoters [5, 6]. In addition, MTM has been found to interfere with the transcription mediated by a cancer-associated fusion gene [2, 7] and to induce differentiation through specific promoter reprogramming mechanisms [8]. However, despite these promising antitumour properties, the appearance of severe systemic toxicities, such as a dose-related bleeding syndrome and liver toxicity, has limited its clinical use [9, 10].

Two different strategies have been proposed to overcome the clinical limitation of MTM. The first one consists in the generation of structurally related analogues. In this regard, MTM derivatives have been proved to enhance antitumour activity and highly improve safety of

MTM [11, 12]. The second strategy relies on the use of nanocarriers to reduce the delivery of the compound in non-tumoural areas, therefore increasing the therapeutic index. In addition, encapsulation of MTM could improve its pharmacokinetic and biodistribution profile [13]. MTM is characterized by a hydrophobic core and an outer hydrophilic shell which clearly limits the encapsulation. MTM has been encapsulated in large vesicles with a drug encapsulation efficiency of 60% for the first time [14]. At a later stage, polymeric nanoparticles were used to entrap MTM [15-17] including polymeric micelles manufactured by a new microfluidic approach. The MTM-loaded nanocarriers enhanced activity and exhibited lower toxicity when compared to the free drug in a study performed for beta-thalassemia [15]. Since MTM had shown promising results for the treatment of pancreatic carcinoma through the inhibition of the transcription factor Sp1, MTM were loaded into polymeric nanoparticles. These nanocarriers showed highly therapeutic efficacy in *in vivo* models of pancreatic carcinoma [17]. Similarly, MTM analogues-loaded polymeric nanoparticle formulations were reported to suppress lung cancer cells effectively [18].

Sarcomas comprise a group of aggressive malignancies which arise from transformed mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) and/or their derived progenitor cells [19, 20]. Despite advances in the clinical management of these diseases, advanced sarcomas often show resistance to cytotoxic drugs such as doxorubicin, cisplatin or ifosfamide, which remain the first therapeutic option [21]. Among the factors contributing to this resistance, it is known that the acquisition of a stem-like phenotype by a subset of tumour cells, the so-called cancer stem cells (CSCs), play a relevant role in the outgrowing of drug-resistant clones and therefore, there is a need for therapies able to target these subpopulations [22].

In sarcomas, both MTM and MTM analogues have demonstrated a promising antitumour activity in Ewing sarcoma models through the specific inhibition of EWS-FLI1-mediated transcription [2, 8]. However, a phase I/II trial conducted to determine the dose-limiting toxicities, pharmacokinetics and activity of MTM in Ewing sarcoma concluded that MTM hepatotoxicity limited its administration at the minimal dose to potentially achieve clinical activity [23]. Later, the discovery of new mechanisms of action and synthetic lethality in Ewing sarcoma have renewed interest in MTM [2, 24]. In addition, MTM analogues have demonstrated potent antitumour activity in MSC-based models of myxoid liposarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma as well as in several primary cell lines of different types of sarcoma [12, 25]. Moreover, several groups have evidenced the great capacity of

MTM and its derived analogues to target CSCs and inhibit stemness in sarcomas and other types of tumours [12, 25-29].

For this work, formulation of MTM-loaded hydrogel, liposomes and polymeric nanoparticles were developed with the aim of enhancing the therapeutic efficacy of MTM for the treatment of sarcoma. The polymeric nanoparticles were based on the FDA-approved Poly(rac-lactide) (PLA), liposomes (LIP) composed of zwitterionic phosphatidylcholine, mygliol and pluronic F-127 were the choice to encapsulate MTM in liposomal formulations, and a urea derivative non-peptidic hydrogelator was the platform to encapsulate MTM in a hydrogel [30]. The different nanoplatfroms were assessed in terms of encapsulation and loading efficiency, release and stability. Furthermore, by using MSC-based and patient-derived models of sarcoma in *in vitro* assays, we demonstrated that all assayed MTM formulations retain the cytotoxic, anti-invasive and anti-stemness potential of free MTM. More relevantly, the treatment of sarcoma xenografts showed that encapsulated MTM is more efficient and tolerable than equivalent doses of free MTM. Additionally, transcriptomic analysis confirmed the ability of encapsulated MTM to repress relevant cancer-related pathways in sarcoma cells. Overall, these MTM delivery systems may represent useful alternatives to reposition MTM as a safe antitumour drug.

## METHODS

### Materials

PLA was synthesised under nitrogen using standard Schlenk techniques by ring-opening polymerisation using zinc alkyl as an initiator [47]. Rac-lactide was purchased from Sigma-Aldrich (Spain), sublimated three times, and stored in a glovebox. Toluene was pre-dried over sodium wire and distilled under nitrogen from sodium. Deuterated solvents were stored over activated 4 Å molecular sieves and degassed by several freeze-thaw cycles. Zinc compound was prepared according to literature procedures [48]. The solvents acetone (ACS reagent), toluene (ACS reagent) and tetrahydrofuran (inhibitor-free, for HPLC, ≥99.9%) were purchased from Sigma-Aldrich (Spain). Poly(vinyl alcohol) (PVA, 31000-50000, 98-99% hydrolysed) were purchased from Sigma-Aldrich (Spain) and used as received. L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (FOS) and Pluronic F-127 were purchased from Sigma-Aldrich (Spain), Miglyol-812 (MCFT) were purchased from Fagron Iberica.

Mithramycin (MTM) was synthesized by EntreChem SL (Oviedo, Spain) by a previously described combinatorial biosynthesis method [49]. Drug stocks were prepared as 10 mM solutions in sterile DMSO, maintained at -20 °C, and brought to the final concentration just before use.

### **Gelation procedure and encapsulation methodology of MTM**

(5-(3-(4-nitrophenyl)ureido)isophthalic acid) (hydrogelator) were obtained by slow pH change generated by the well-controlled hydrolysis of glucono- $\delta$ -lactone (GL) [30]. In a passive loading methodology 10 mg of hydrogelator were dissolved in 1 mL of 0.1 M aqueous NaOH. 1 mL of an aqueous solution of MTM (3 mg/mL) was added on the previous solution along with 2.5 mg of GL. The resulting solution was stored for 24h for gelation. The formation of the composite gel was confirmed macroscopically by the observation of no gravitational flow upon the test tube inversion method.

### **Liposomal formulation of MTM**

Free cholesterol liposomes were formulated by ethanol injection and evaporation solvent method [32, 33]. Briefly, 20 mg of FOS and 70  $\mu$ l of MCFT were dissolved in 250  $\mu$ l of ethanol. 3 mg of MTM were dissolved in 4,75 mL of acetone and were mixed with lipids to form the organic phase. The organic phase was added dropwise over Pluronic F-127 solution (1 mg/mL) under vigorous stirring and homogenized 10 min at 14000 rpm. The organic solvent was evaporated under reduced pressure at 40°C for 20 min. The liposomes suspension was dialyzed against mQ water for 1h at 25 °C in a 3,500 MWCO dialysis cassette to eliminate the excess of surfactant and unencapsulated MTM. The mQ water after dialysis was used to calculate the encapsulation efficiency and loading efficiency of formulations.

### **Polymeric nanoparticles formulation**

MTM loaded NPs (MTM-NPs) were formulated by nanoprecipitation and displacement solvent method [31]. Briefly, 80 mg of PLA and 10 mg of MTM were dissolved in 6 mL of acetone to form the organic phase. Then, the organic phase was added dropwise over 10 mL of PVA solution (1%) with a flowrate of 2 ml/min under continuous stirring. The acetone was evaporated under reduced pressure to form the NPs suspension. After centrifugation at 15000 rpm for 20 min, the MTM-NPs were collected and washes several times to eliminate

unencapsulated MTM and excess of surfactant. The MTM-NPs were resuspended in mQ water for subsequent freeze drying and stored at -20°C to use in all other experiments.

### **Characterization of formulations**

SEM images were recorded on a Jeol 6490LV electron microscope to evaluate the size and morphology of the particles. High resolution electron microscope images were acquired on a Jeol JEM 2100 TEM microscope operating at 200 kV and equipped with an Oxford Link EDS detector. As the specimens were sensitive to beam irradiation, observation was performed under low-dose conditions. The resulting images were analyzed using Digital Micrograph™ software from Gatan. The average sizes, polydispersities and Z-potentials of the formulations were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) Data were analysed using the multimodal number distribution software included with the instrument.

### **Efficiency and loading efficiencies**

To calculate the loading efficiency and encapsulation efficiency for MTM-NPs, 1 mL of DMSO was added to NPs to dissolve both polymer and drug and the mixture was subjected to bath sonication for 30 min. MTM loading was measured in a spectrophotometer at 570 nm of wavelength.

Loading efficiency of liposomes and encapsulation efficiency were calculated by using the difference of MTM feeding and the non-encapsulated MTM found in the supernatant after dialysis in phosphate buffered saline medium.

LE and EE of MTM were calculated according to the following equations:

$$LE\% = \frac{\text{weight of encapsulated MTM (mg)}}{\text{weight of total (MTM encapsulated + scaffold weight)(mg)}} \times 100$$

$$EE\% = \frac{\text{weight of encapsulated MTM (mg)}}{\text{weight of MTM feeding (mg)}} \times 100$$

### **Release studies**

MTM-loaded NPs. 10 mg of lyophilized MTM-NPs were placed in dialysis membrane (molecular weight cut off: 3,500 KDA) and incubated in 10 mL of Phosphate Buffered-Saline (PBS, pH 7.4). The suspension was incubated at 37°C with continuous stirring (50 rpm) in a IKA incubator shaker KS 3000. At different intervals of incubation 3 mL of release

medium was removed to measure fluorescence emission in a fluorimeter at 570 nm of wavelength.

MTM-loaded LIP. 1 mL of liposomes suspension were released in the same method described above.

MTM-loaded HG. In a spectrophotometer cuvette were placed 0.25 mL of MTM-HG and 2.75 mL of PBS (pH 7.4) and were incubated at 37 °C. At different intervals of incubation, the amount of MTM released to PBS were measured in a fluorimeter at 570 nm of wavelength.

### **Stability studies**

The NPs were incubated at 37°C (1 mg·mL<sup>-1</sup>) in PBS and Liposomes were incubated at 37°C resuspending 100 µL of liposomes in 1 mL of PBS. The average size (nm) and PDI were determined over time by DLS measurements. The stability of the MTM-LIP was also performed in 10% human blood plasma (obtained from the Blood Donor Center of the University Hospital of Albacete, CHUA, Spain). MTM-LIP were incubated at 37°C, at a concentration equal to 1 mg·mL<sup>-1</sup>. The hydrodynamic radius (RH) of the formulation was calculated at predetermined intervals of time by DLS measurements.

### **Cell models**

The myxoid liposarcoma model MSC-5H-FC cells were generated upon sequential mutation of human bone marrow MSCs with up to 6 oncogenic events: i) hTERT overexpression; ii) P53 and iii) Rb inactivation using E6 and E7 antigens of the HPV-16; iv) inactivation of PPA2 phosphatase with SV40 small T antigen; v) expression of oncogenic H-RASv-12; and vi) expression of fusion oncogene FUS-CHOP (FC) [50-52]. T-5H-FC#1 is a cell line derived from a xenograft tumour generated by MSC-5H-FC cells and represent a more aggressive myxoid liposarcoma model than its parental cell line [35, 52]. The related undifferentiated pleomorphic sarcoma model T-5H-O cells (which were targeted with above described mutations i) to v) [35]) expressing the SORE6 lentiviral reporter system (T-5H-O-SORE6-GFP cells) or its negative gating control (T-5H-O-minCMV-GFP cells) were previously generated and characterized [25]. T-CDS-17#4 is a cell line derived from a xenograft generated by the patient-derived chondrosarcoma primary cell line CDS-17, which have been comprehensively characterized at genomic and functional level elsewhere [53]. The identity of these cell lines has been authenticated by a Short Tandem Repeats



analysis during the last 5 months. All the cell types were cultured as previously described [12, 53].

### **Cell viability assays**

The viability of cell lines in the presence and absence of drugs was determined using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) after 72 hours-treatments as described before [12]. The concentration of half-maximal inhibition of viability (IC<sub>50</sub>) for each treatment was determined by non-linear regression using GraphPad Prism version 8.0 (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA). Alternatively, the cytotoxic potential of the assayed treatments was assayed in colony formation unit (CFU) assays as described previously [54]. In these assays, cells were treated for 24 hours and left to form colonies in drug-free medium for 10 days. The surviving fraction was determined by dividing the average number of colonies for each treatment by the average number of colonies in the control. For the administration of MTM-HG, vortex occasionally before incubation is needed to eventually handle the sample using a syringe. Then, MTM-HG is subsequently added to each well and the cells are incubated as described.

### **Tumoursphere Culture**

Tumoursphere formation protocol and the analysis of the effects of drugs on tumoursphere formation ability were previously described [12, 55].

### **Three-dimensional spheroid invasion assay.**

Cell spheroids were prepared using a hanging drop protocol as previously described [56]. Then each cell spheroid was transferred to an individual well of 96-well plate and embedded into a volume of 70  $\mu$ l of 3 mg/ml bovine collagen type I matrix (PureCol) from Advanced Biomatrix (San Diego, CA) and filled with 100  $\mu$ l of complete media. Cell invasion in the presence or not of free or encapsulated MTM was monitored using a Zeiss Cell Observer Live Imaging microscope (Zeiss, Thornwood, NY) and images were acquired every 6 hours during 24 hours using a Zeiss AxioCam MRc camera. The invasive area was determined by calculating the difference between the final area ( $t = 24$  h) and the initial area ( $t = 0$  h) using the Image J analysis software, and data were normalized to the control cells. 3 independent experiments including 4 replicates for each condition were performed.

### **Detection of SORE6 activity by flow cytometry**

The lentiviral reporter systems in which a SORE6 element coupled to a minimal cytomegalovirus (mCMV) drive the expression of GFP (SORE6-mCMVp-dsCopGFP-Puro) and the corresponding control lacking SORE6 (mCMVp-dsCopGFP-Puro) were previously generated and characterized [36] and kindly donated by Dr. L.M. Wakefield (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Sarcoma cells expressing the SORE6 system (T-5H-O-SORE6-GFP cells) or its negative control (T-5H-O-minCMV-GFP cells) were previously generated and described [25]. The level of SORE6-driven GFP fluorescence in untreated cultures or after different drug treatments were analyzed by flow cytometry using a BD FACS Aria II Cell Sorter (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium). Control T-5H-O-minCMV-GFP cells were used as matched SORE6 negative control for gating purposes.

### **Western Blotting**

Whole cell protein extraction and Western blot analysis were performed as previously described [57]. Primary antibodies used in these analyses were as follow: anti-SP1 [(9389), 1:1000 dilution] and anti-Survivin [(2808), 1:1000] from Cell Signaling (Danvers, MA); anti-c-MYC [(sc-40), 1:100], anti-VEGF [(sc-57496), 1:100] and anti-Bcl-2 [(sc-783), 1:100] from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX); and anti- $\beta$ -Actin [(A5441), 1:10,000] from Sigma. Detection and quantification of the protein bands (IRDye fluorescent signals) was performed using the Odyssey Fc imaging system and the software Image Studio from LICOR (Lincoln, NE).

### **RNA seq**

High-quality RNA samples were used to prepare RNA-seq libraries according to NEBNext® Ultra Directional RNA library protocol (New England Biolabs, Ipswich, MA). cDNA libraries were checked for quality and quantified using the DNA-1000 kit (Agilent) on a 2100 Bioanalyzer. Paired-end sequencing was performed on an Illumina Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) using 150-base reads. Then pseudo-alignment and quantification of transcripts were made with Salmon algorithm (reference genome GRCh38). Correlation analysis, principal component study and differential expression analysis were performed with DESeq2 package. Differential gene expression analysis was done using the parametric Wald test with Benjamini-Hochberg adjustment (padj). Genes with padj < 0.01 and (fold change  $\leq -2$  or  $\geq 2$ ) were considered significantly expressed genes. FGSEA package (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/fgsea.html>) was used

for gene set enrichment analysis of KEGG pathways and GO terms (Cellular Component - Biological Processes - Molecular Function).

### **Treatment of tumour xenografts**

All experimental protocols were carried out in accordance with the institutional guidelines of the University of Oviedo and were approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Oviedo. Female athymic nude mice of 6 weeks old (Envigo, Barcelona, Spain) were inoculated subcutaneously (s.c.) with  $5 \times 10^5$  T5H-FC#1 cells. Once tumours reached approximately 100 mm<sup>3</sup>, the mice were randomly assigned (n=5 per group) to receive the following intravenous treatments twice a week (6 doses): vehicle (PBS), 1 mg/Kg MTM, 2 mg/Kg MTM, 1 mg/kg MTM-LIP or 2 mg/Kg MTM-LIP. Mean tumour volume differences between groups were determined using a caliper as described [58]. Relative tumour volume (RTV) for every xenograft was calculated as follows:  $RTV = \text{tumour volume at day of measurement (V}_t) - \text{tumour volume at the beginning of the treatment (V}_o)$ . Drug efficacy was expressed as the percentage tumour growth inhibition (%TGI), calculated using the equation  $100 - (T/C \times 100)$ , where T is mean RTV of the treated tumour and C is the mean RTV in the control group at day of measurement. Animals were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation when tumours of the control series reached approximately 1000 mm<sup>3</sup>. Livers were extracted and processed for histological analysis as previously described [59].

### **Statistical Analyses**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Data are presented as the mean ( $\pm$  standard deviation or SEM as indicated) of at least three independent experiments. Two-sided Student's t test was performed to determine the statistical significance between groups. Multiple comparisons of the data were performed using the one-way ANOVA, Turkey's test.  $p < 0.05$  values were considered statistically significant.

## **RESULTS**

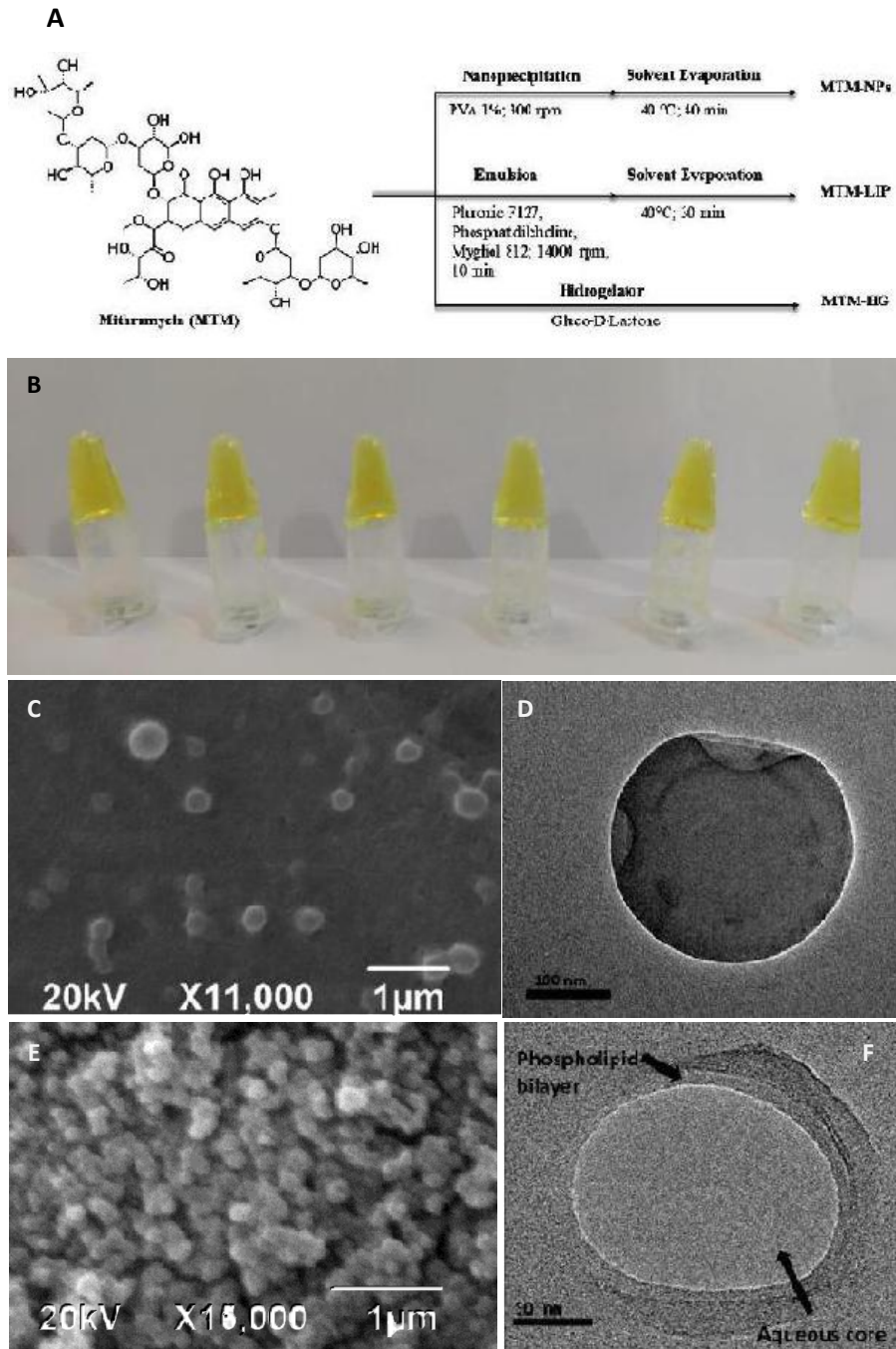
### **Formulation, characterization, and stability of platforms**

MTM-loaded polymeric nanoparticles (MTM-NPs) were generated by the nanoprecipitation method [31] (**Figure 1A**). MTM-loaded liposomal formulations (MTM-LIP) were prepared

by ethanol injection and evaporation solvent method [32, 33]. MTM-to-lipid ratio of 1:5 w/w and a temperature of 40°C were used for MTM encapsulation (**Figure 1A**). MTM-loaded hydrogels (MTM-HG) were obtained by passive loading after slow pH change of the hydrogelator 5-(3-(4-nitrophenyl)ureido)isophthalic acid generated by the well-controlled hydrolysis of glucono- $\delta$ -lactone (GL) (**Figure 1A-B**) [30]. MTM displays the capability of interaction with the hydrogel network by  $\pi$ - $\pi$  stacking and the possibility of forming hydrogen bonds due to the presence of –OH groups in its chemical structure. MTM uptake was monitored by UV-visible spectroscopy.

Table 1 displays average size, polydispersity index (PDI), Z-potential, encapsulation (EE%) and loading efficiency (LE%) of liposomal, polymeric formulations, and the blank formulations. The non-loaded and MTM-loaded nanocarriers had a hydrodynamic radius (RH) close to 80 nm with a very low PDI. The Z-potential of the nanoplatforms showed high physical colloidal stability. Also, the LE and EE of MTM-NPs and MTM-LIP were calculated to be 3,1% $\pm$ 1,7% and 22,7% $\pm$ 2,5%, and 35,0% $\pm$ 0,4% and 92,5% $\pm$ 1,5, respectively. The particle size of MTM-NPs was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) with a diameter of 311 $\pm$ 10 nm as measured with Jeol image acquisition software (**Figure 1C**), and spherical morphology as shown in the corresponding transmission electron microscopy (TEM) image (**Figure 1D**). SEM and TEM showed globular liposomes and the aqueous core and the phospholipid bilayer could be identified (**Figure 1E-F**).

The storage stability of the formulations over time was studied in phosphate buffer saline (PBS). The values of RH (nm) and PDI of the MTM-LIP and MTM-NPs were monitored by dynamic light scattering (DLS) at room temperature (**Figure 2A-B**). Negligible increase in either particle size or PDI during a 7-day long experiment denoted high stability against aggregation for both formulations. The stability of the MTM-LIP was also performed in 10% human blood plasma (**Figure S1**). The negligible changes of the liposomes suggested again a high stability against aggregation this time in simulated biological media. The slight increase in RH during the first days can be related to the adsorption of a protein monolayer [34].

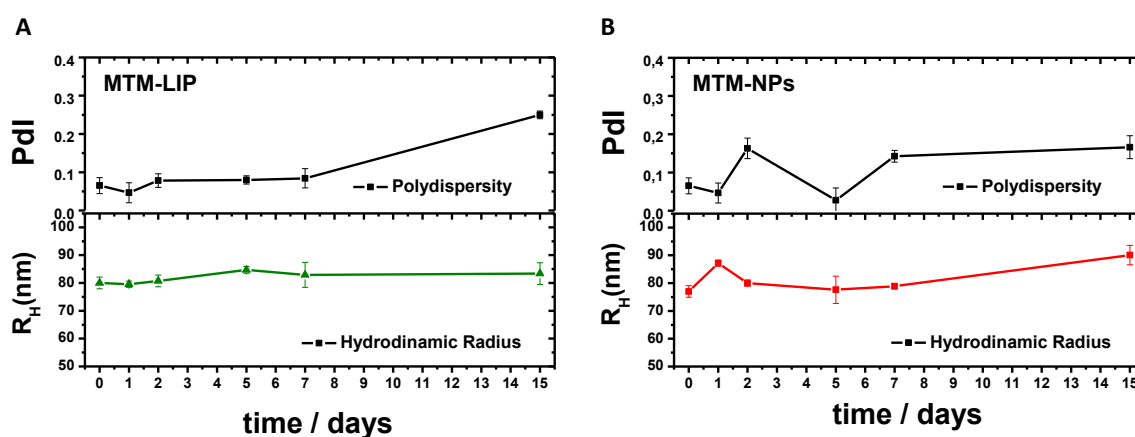


**Figure 1.** Formulation and morphology of MTM-NPs, MTM-LIP and MTM-HG. (A) Schematic formulation all nanodevices. (B) Image of MTM-HG. (C) SEM image of MTM-NPs (scale bar = 1µm). (D) TEM image of MTM-NPs (scale bar = 100 nm). (E) SEM image of MTM-LIP (scale bar = 1µm). (F) TEM image of MTM-LIP (scale bar = 100 nm)

**Table 1.** Characterization of MTM-loaded nanodevices.

Formulation	R <sub>H</sub> , (nm)	PDI	Z-Potential (mV)	EE%	LE%
MTM-NPs	158,9±0,9	0,16±0,1	-31,9±0,9	22.7±2.5	3.1±1.7
MTM-LIP	81,1±0,2	0,08±0,1	-27.6±0.9	92.49±1.5	35±0,4
NPs	75,5±0,5	0,1±0,1	-24,5±0,5	-	-
LIP	86,9±0,8	0,1±0,1	-17,1±1,7	-	-

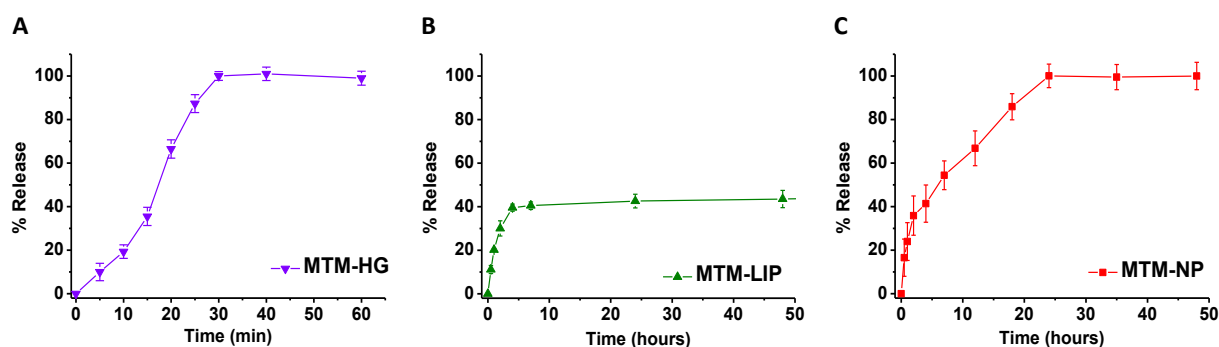
Hydrodynamic radius (R<sub>H</sub>), polydispersity index (PDI), Z-potential, encapsulation efficiency (EE%), and loading efficiency (LE%) of the formulations. Errors are 2σ



**Figure 2.** Storage stability of MTM-loaded nanodevices. DLS analysis showing the stability of MTM-LIP (A) and MTM-NPs (B) nanoplatforms in PBS (pH 7.4). Data are expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments.

## Release studies

*In vitro* MTM release from each formulation was investigated in pH 7.4 PBS at 37°C. As shown in Figure 3, different patterns were observed for each formulation. MTM-HG showed a two-stage release mechanism, a first release of the MTM molecules located at the surface followed by the MTM release from HG aggregates. In any case, drug release from HG is fast, with a full delivery of MTM after 30 min (**Figure 3A**). In the case of MTM-LIP, a significant burst release was observed during the first 5 hours followed by a slow release which did not exceed 40% after 50 hours (**Figure 3B**). In contrast, a relative fast release of MTM from MTM-NPs was observed in the initial 2 h. This initial phase was followed by a sustained release in which complete MTM delivery was achieved within 24h (**Figure 3C**).

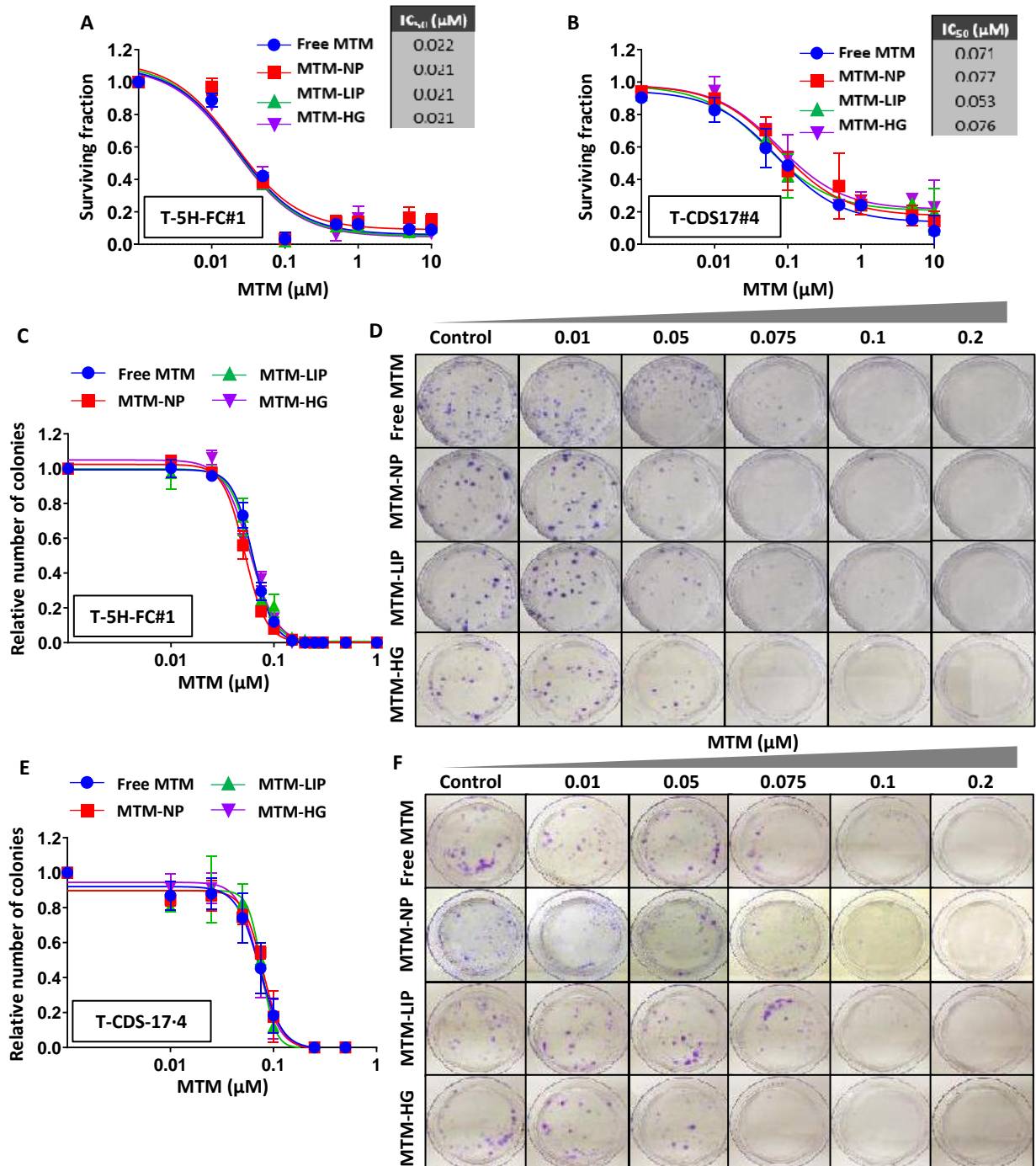


**Figure 3.** *In vitro* release profiles. Release kinetics MTM-HG (A), MTM-LIP(B) and MTM-NPs (C) in PBS (pH 7.4) at 37 °C.

### Antitumour effects of free and nanoencapsulated MTM in sarcoma cells.

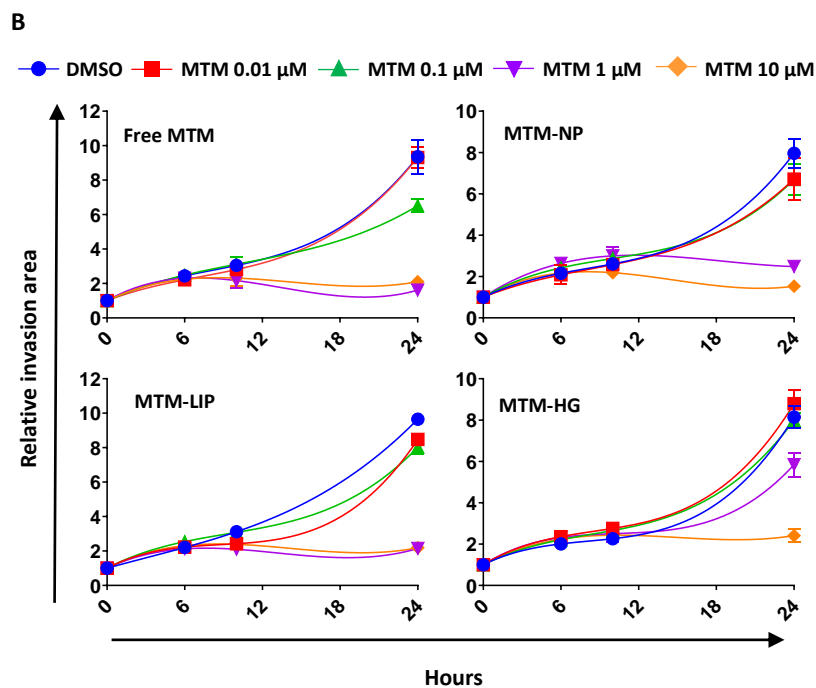
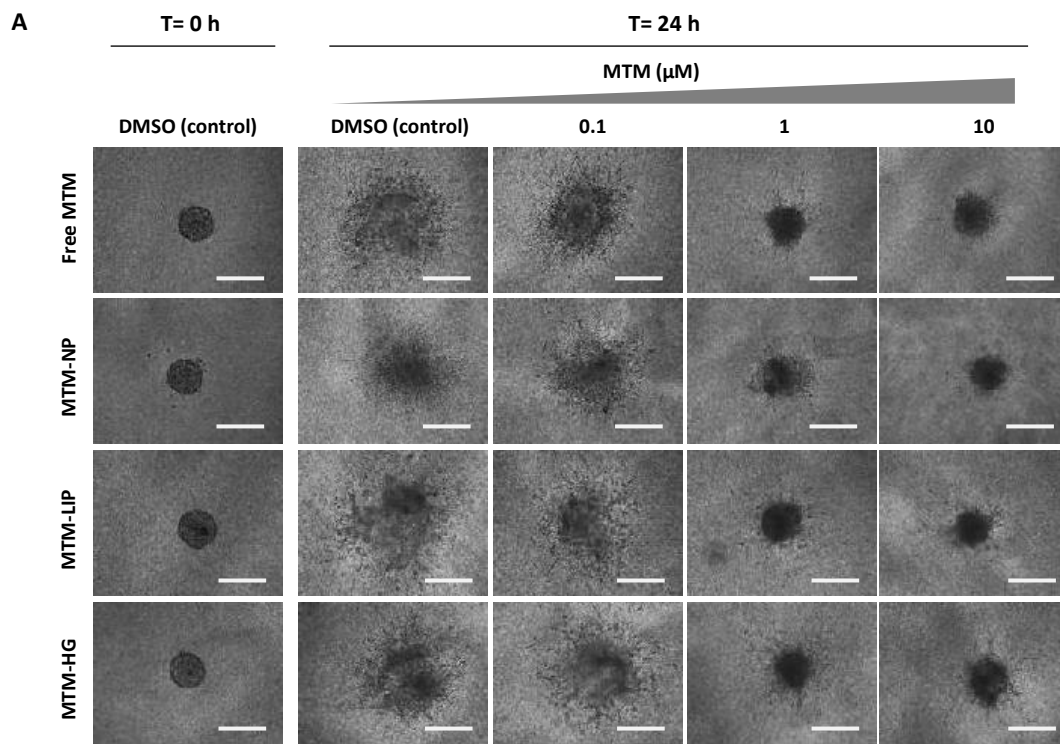
In order to study the ability of different MTM formulations to target sarcoma cells, the induction of cell toxicity in dose-response cell survival assays was firstly evaluated. After 48-hour treatments, the liposarcoma models MSC-5H-FC and T-5H-FC#1 displayed a similar response to free MTM and MTM-NPs, MTM-LIP and MTM-HG (**Figure S2A-B**). These levels of antitumour activity in T-5H-FC#1 cells were reproduced by MTM-NPs that were stored at 4°C for 2 weeks, thus confirming the high stability of these formulations (**Figure S2C**). Notably, empty devices of all formulations were unable to induce cell toxicity at any assayed concentration (**Figure S2A-B**). As expected, MTM increased its antitumour activity after a longer treatment of 72 hours in T-5H-FC#1 cells, reaching IC<sub>50</sub> values of approximately 20 nM for both free and nanocarrier delivered MTM (**Figure 4A**). Likewise, T-CDS17#4 chondrosarcoma cells were also sensitive to nanomolar concentrations of MTM (IC<sub>50</sub> ≈ 50 - 70 nM) and showed a similar response to all MTM formulations (**Figure 4B**). Further exploring the antiproliferative effects of free and nanoencapsulated MTM, we also confirmed that all treatments showed a similar efficiency to target both T-5H-FC#1 (**Figure 4C-D**) and T-CDS17#4 (**Figure 4E-F**) cells in colony-forming assays.

Next, we analysed the effect of MTM formulations to alter the invasive properties of sarcoma cells. With this aim, we studied the ability of T-5H-FC#1 spheroids to invade 3D collagen matrices. We found that concentrations of free MTM equal or higher than 1 μM were able to completely suppress cell invasion after 24 hours. Similar results were found for MTM-NPs and MTM-LIP, whereas MTM-HG showed only a partial response after a 1 μM treatment (**Figure 5** and **Figure S3**).



**Figure 4. Antiproliferative effects induced by free and nanocarrier delivered MTM in sarcoma.** (A-B) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of T-5H-FC#1 (A) and T-CDS17#4 (B) cells with increasing concentrations of free MTM or MTM loaded in polymeric nanoparticles (MTM-NP), nano-emulsions (MTM-LIP) and hidrogels (MTM-HG) for 72 hours. IC<sub>50</sub> values for each condition are shown. (C-F) Colony formation unit (CFU) assays in of T-5H-FC#1 (C-D) and T-CDS17#4 (E-F) cells treated with increasing concentrations of the indicated MTM formulations for 24 hours and left to form CFUs for 10 days. Summary graphics (C and E) and representative pictures of a colony formation assay (D and F) for each cell type are shown. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.





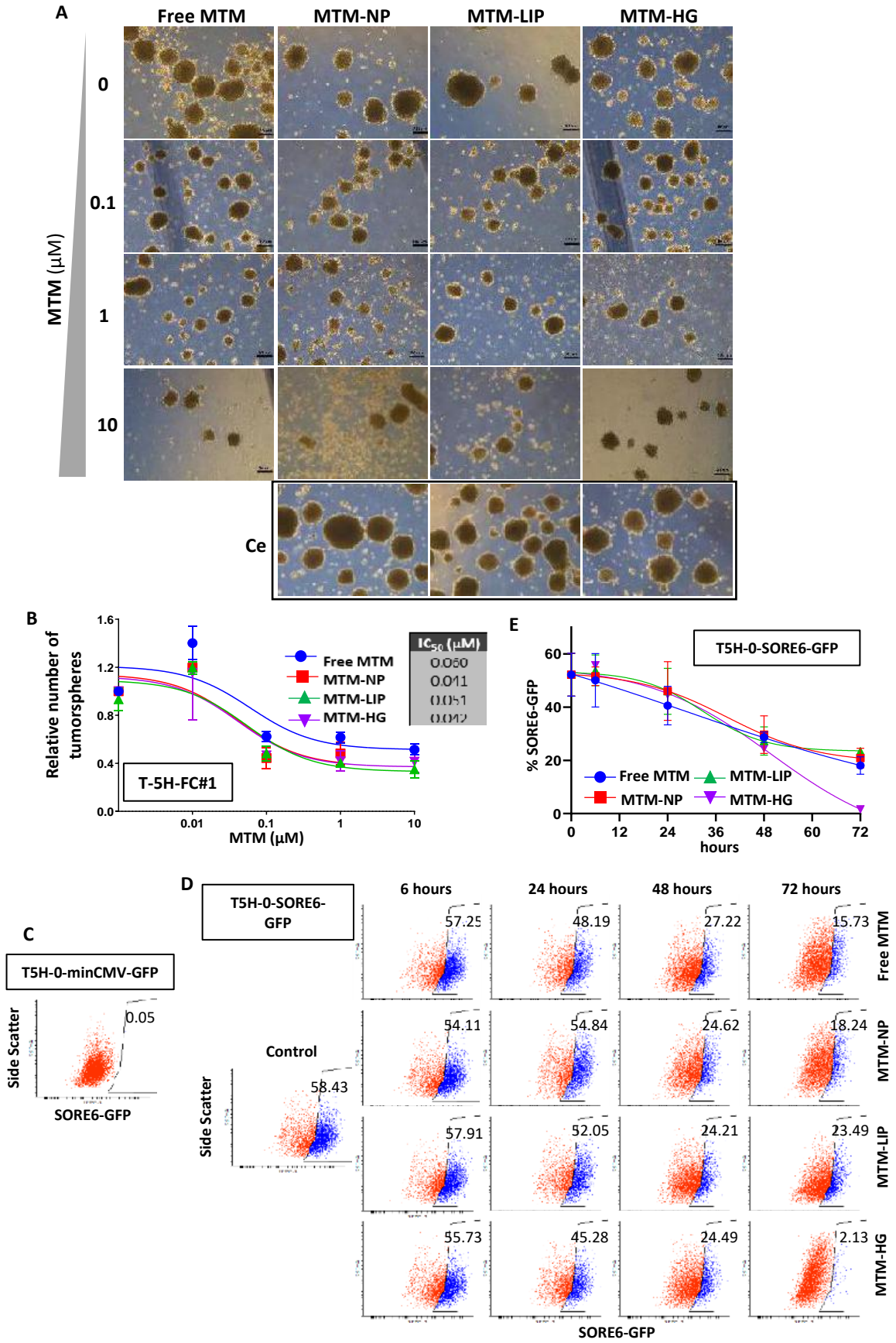
**Figure 5.** Effect of free and nanocarrier delivered MTM on cell invasion. (A-B) 3D spheroid invasion assays in T-5H-FC#1 cells treated for 24 h with either DMSO (vehicle) or the indicated concentrations of the different MTM formulations. Representative images of spheroids at initial ( $t = 0$ ) and final time ( $t = 24$  h) (A) for the different treatments and the quantification of the invasive area at the indicated times (B) are displayed. Scale bars =  $200\mu\text{m}$ . Data (mean and standard deviation) are calculated from at least 6 spheroids per condition and time point and expressed relative to DMSO-treated cells.

### **Nanocarrier delivered MTM targets CSC subpopulations in sarcoma.**

MTM and its recently developed analogues has demonstrated their ability to target tumour subpopulations presenting CSC properties in several types of tumours, including sarcomas [12, 25-29]. Therefore, we studied the effect of MTM nano-encapsulation on its ability to inhibit the growth of CSC-enriched 3D clonal sphere cultures (tumourspheres) of T-5H-FC#1 cells. Importantly, we have previously demonstrated that this tumoursphere model was highly enriched in CSCs as seen by their increased ability to initiate tumour growth in transplantation assays in immunocompromised mice [35]. Using this model, we found that both free MTM and all assayed MTM nanocarrier systems were similarly able to reduce the number ( $IC_{50} \approx 40 - 60$  nM) and the size of T-5H-FC#1 tumourspheres, without observing any toxic effect after the treatment with empty nanoparticles (**Figure 6A-B**).

To further confirm the ability of MTM formulations to target CSC subpopulations in sarcomas, we made use of a previously developed model of undifferentiated pleomorphic sarcoma (T-5H-O cells) expressing a lentiviral reporter system which include a composite SOX2/OCT4 response element (SORE6) coupled to a cytomegalovirus promoter to drive the expression of the GFP reporter gene (T-5H-O-SORE-GFP cells) [25, 36]. The SORE6 reporter allows the dynamic monitoring of CSC subpopulations based on transcriptional activity due to the pluripotency factors SOX2 and OCT4. In addition, this reporter has proven its efficacy to test the potential of antitumour drugs to target CSC subpopulations [25, 37]. In this system, cells carrying a control construction without SORE6 (T-5H-O-minCMV-GFP cells) were used as gating controls in flow cytometry analyses (**Figure 6C** and **Figure S4**). To analyse the effect of MTM on CSC subpopulations, T-5H-O-SORE-GFP cells were treated with  $IC_{50}$  concentrations of free MTM, MTM-NPs, MTM-LIP and MTM-HG in time-course experiments. As shown by flow cytometry analysis, all MTM formulations induced a gradual reduction of SORE6+ subpopulation that reached a 75-95% decrease after 72 hours of treatment (**Figure 6D-E**), thus confirming the ability of MTM, both delivered free or nanoencapsulated, to target CSCs in sarcomas.

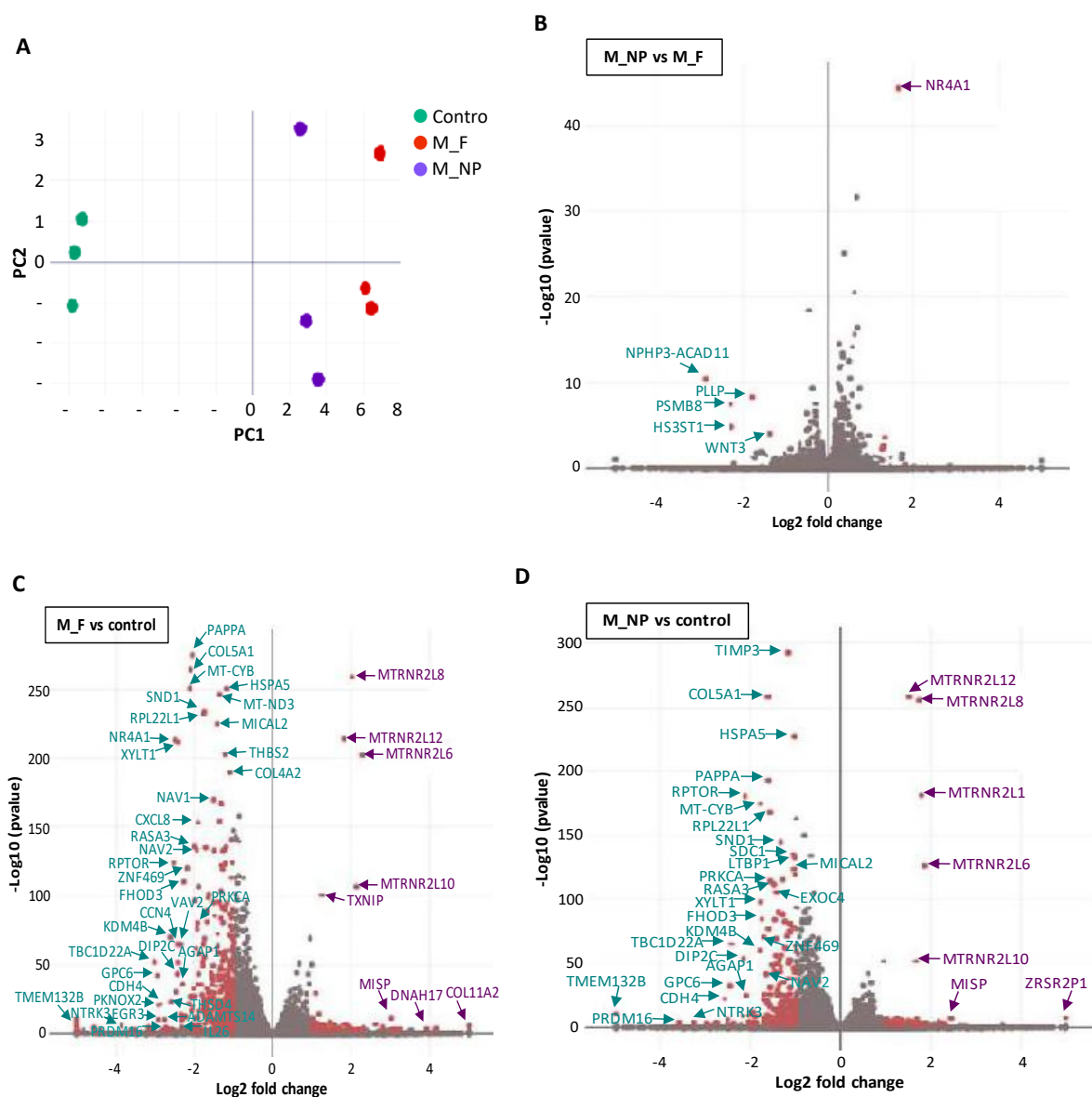
Altogether, we found that all assayed MTM-loaded nanoparticles were able to closely mimic the anti-proliferative, anti-invasive and anti-stemness effects of free MTM in different sarcoma models.



**Figure 6.** Effect of free and nanocarrier delivered MTM on CSC subpopulations. (A-B) CSC-enriched tumorspheres of T-5H-FC#1 cells were treated with increased concentrations of the indicated MTM formulations for 72 hours. Treatments with an amount of empty nanoparticles corresponding to 10  $\mu$ M (Ce) were also included. Representative images of the spheres cultures (A) and the quantification of the spheres (represented as % of control) (B) remaining at the end of experiment are shown. Scale bars = 250  $\mu$ m. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments. (C-E) Analysis of the percentage of cells presenting transcriptional activity of the pluripotency factors SOX2 and OCT4 (SORE6 activity) after the treatment with free or encapsulated MTM. (C-D) Representative flow cytometry analysis of the SORE6+ population in untreated T5H-O-minCMV-GFP (gating control) (C) and in T5H-O-SORE6-GFP cells treated for with 20 nM MTM for the indicated times (D). (E) Graph showing the mean and standard deviation of 3 independent experiments.

### **Gene expression profiling of MTA-treated sarcoma cells.**

To gain insight into the mechanisms involved in the anti-tumour effects of MTM in sarcoma cells and analyse whether these molecular features could be influenced by nanoencapsulation, we performed RNAseq analyses of T-5H-FC#1 cells treated with the IC50 values (25 nM) of free MTM and MTM-NPs or the drug vehicle for 24 hours. First, we used the gene expression data obtained from triplicate samples of each condition to conduct a principal component (PC) analysis. Both free MTM and MTM-NPs treated samples group with close PC1 values but far from control samples (**Figure 7A**). Then, we selected differentially expressed genes (DEG) (fold change  $\leq -2$  or  $\geq 2$  and  $p_{adj} < 0.01$ ) in MTM-NPs vs free MTM, free MTM vs control and MTM-NPs vs control comparisons. In agreement, with the result of the PC analysis, the gene expression profiles of cells treated with MTM-NPs or free MTM were very similar, with only 5 downregulated and 4 upregulated DEGs between these conditions (**Figure 7B** and **Table S1**). In comparisons against the control condition, we found that free MTM induced a higher level of gene expression modulation (522 DEGs) (**Figure 7C** and **Table S2**) than MTM-NPs (242 DEGs) (**Figure 7D** and **Table S3**). In any case, as expected, there was a high degree of overlapping between genes regulated by both treatments (83% of DEGs in MTM-NPs treated cells were also modulated in free MTM-treated cells). Significantly, this analysis showed that MTM (whether free or encapsulated) induced a general repression of gene expression. Thus, 400 of the 522 DEGs in cells treated with free MTM (**Figure 7C** and **Table S2**) and 201 of the 242 DEGs in MTM-NPs treated cells (**Figure 7D** and **Table S3**) were downregulated.



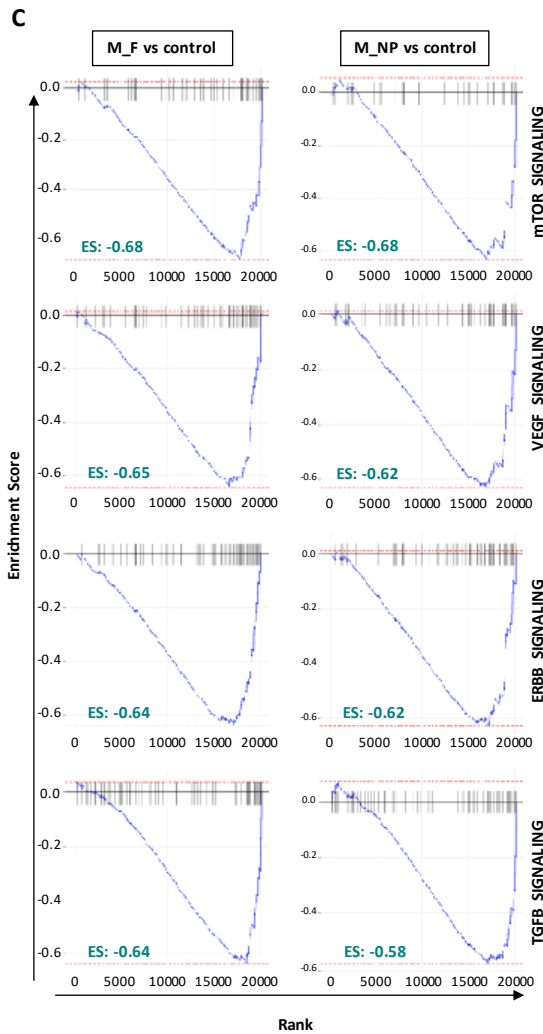
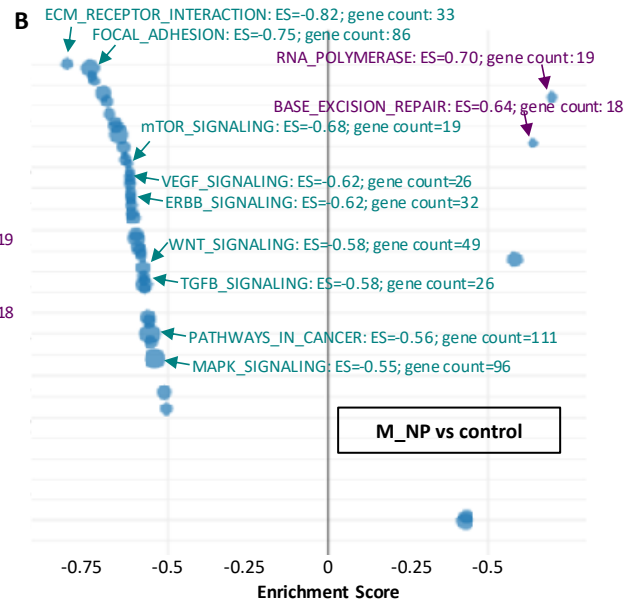
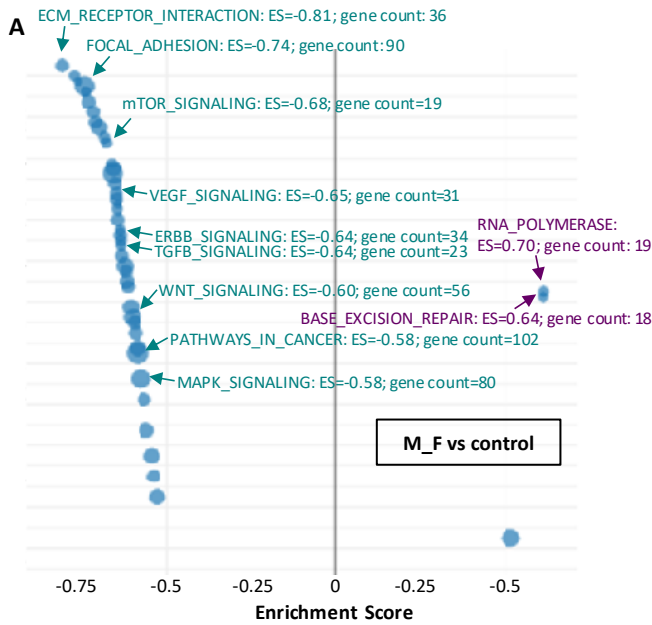
**Figure 7.** Transcriptome analysis of cells treated with free and nanocarrier delivered MTM. RNA seq analysis of T-5H-FC#1 cells treated in triplicate with either DMSO (control), 25 nM free MTM (M\_F) or 25 nM MTM-NP (M\_NP) for 24 hours. (A) Principal component analysis of all analyzed samples. (B-D) Volcano plots showing those genes significantly up-regulated and downregulated (fold change  $\leq -2$  or  $\geq 2$  and  $p_{adj} < 0.01$ ; red dots) when comparing M\_NP vs M\_F (B), M\_F vs control (C) and M\_NP vs control (D). Selected genes displaying highly significant pvalues and/or high fold change modulation are indicated.

These common patterns of gene expression also resulted in the modulation of common signalling pathways by free MTM and MTM-NPs. Thus, KEGG pathways analyses of DEGs showed that 93% of altered signalling routes were mutually modulated by both treatments. In line with the gene expression downregulation observed after the treatments, most of these

pathways (47 out of 50 altered pathways in MTM-NPs and 43 out of 46 in free MTM) displayed significant negative enrichment scores ( $ES < -0.5$  and  $padj < 0.01$ ) and were therefore predicted to become inhibited both in free MTM and MTM-NPs-treated cells (**Figure 8A-B**, Table S4 and Table S5). Among these commonly repressed pathways we found several routes that are frequently over-activated in cancer, such as ECM receptor interaction, focal adhesion, mTOR signaling, VEGF signaling, ERBB signaling, TGF $\beta$  signaling or WNT signaling (**Figure 7A-B**). Likewise, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) confirmed the inactivation of these relevant signaling pathways after the treatment with both MTM formulations (**Figure 8C**). On the other hand, only 3 pathways, related to RNA polymerase activity and base excision repair, were predicted to be activated after MTM treatment, regardless of free or encapsulated delivery of the drug (**Figure 8A-B**).

One of the best described anti-tumour mechanisms of action for MTM is their ability to inhibit the expression of the pleiotropic SP1 transcription factor and its downstream signaling [5, 6]. Therefore, we compared the ability of free MTM and encapsulated MTM to inhibit the expression of SP1 and several well-known SP1 downstream targets [6, 38]. First, by using RNAseq data, we found a robust pattern of gene expression repression in a wide panel of SP1-modulated genes both in free MTM and MTM-NPs treated cells (**Figure 8D**). Then, we confirmed at protein level that all MTM formulations were able to inhibit the expression of SP1 and its targets, c-MYC, Survivin, VEGF, and BCL2 (**Figure 9**). In T-5H-FC#1 cells, we observed an efficient time-course (**Figure 9A**) and dose-response dependent (**Figure 9B**) ability of MTM, irrespective of whether it was delivered free or encapsulated, to repress all analyzed targets. An MTM concentration of 0.1  $\mu$ M was able to almost completely repress all targets after 48 hours of treatment. Notably, no effect was observed after the treatment with empty nanoparticles (**Figure 9A**). Likewise, all MTM formulations showed a similar dose-dependent ability to inhibit SP1 and SP1 targets in T-CDS-17#4 cells (**Figure 9C**).

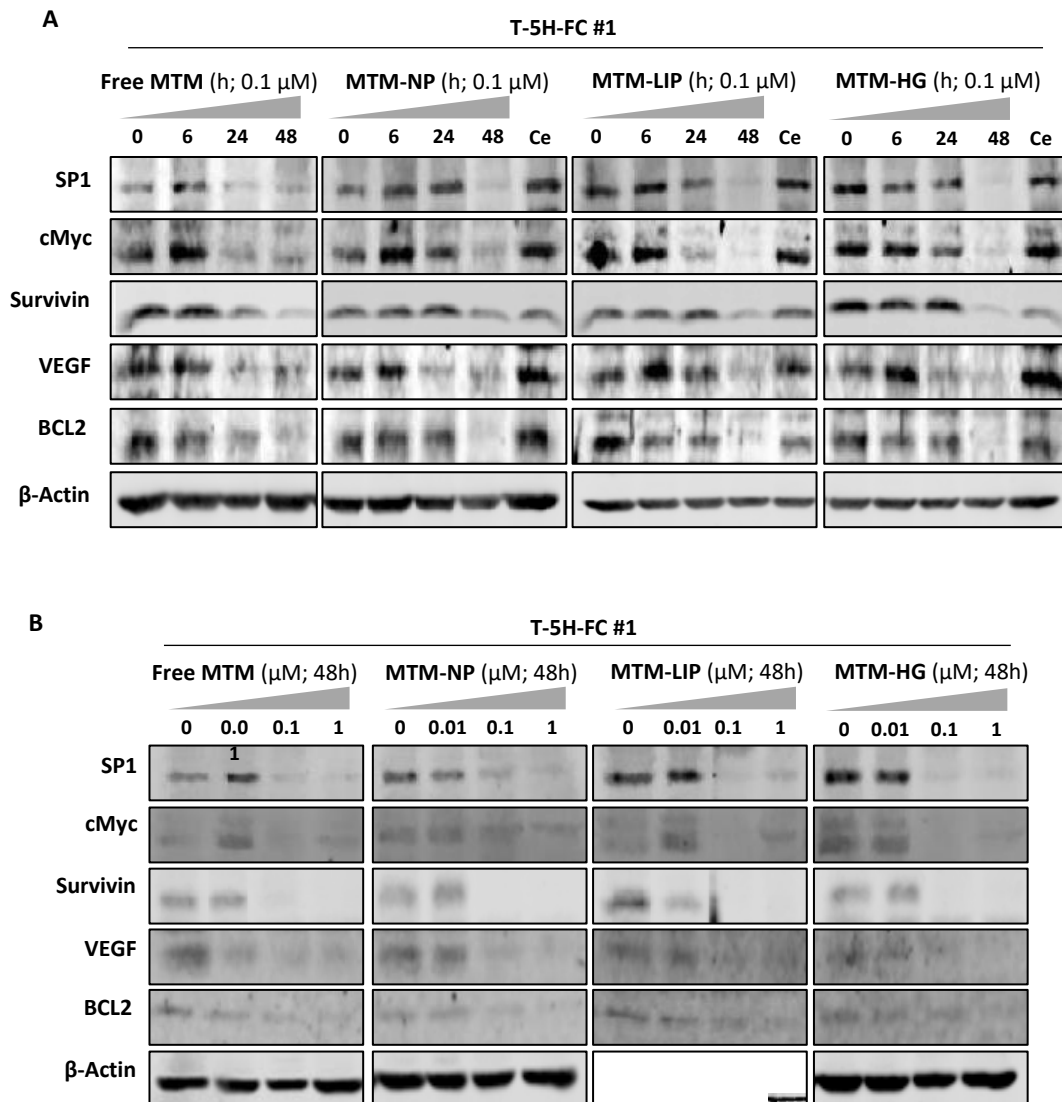
In sum, these results confirmed that MTM encapsulated in NPs, LIP and HG retain the ability of free MTM to repress relevant cancer-related pathways in sarcoma cells.



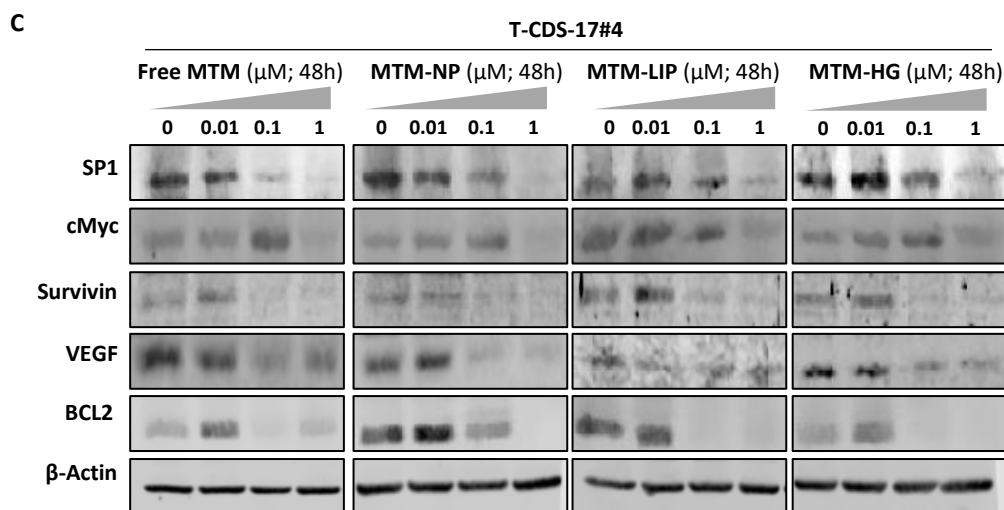
**D**

gen	M_F vs control		M_NP vs control	
	Log2-FC	padj	log2-FC	padj
<b>proliferation</b>				
HDAC4	-1.150	2.51E-03	-1.236	1.35E-05
TGFB2	-0.774	3.76E-26	-0.734	2.02E-23
LRRC32	-0.764	4.90E-09	-0.837	1.44E-10
MTOR	-0.708	3.07E-25	-0.389	7.21E-06
EGFR	-0.697	3.35E-34	-0.538	2.25E-20
IGF1R	-0.575	3.07E-03	-0.196	1.34E-01
TGFB1	-0.409	1.87E-06	-0.268	2.89E-03
MYC	-0.276	6.87E-06	-0.110	3.38E-02
<b>angiogenesis</b>				
VEGFA	-1.265	6.54E-81	-0.986	1.48E-59
THBS2	-1.218	2.1E-203	-0.988	5.1E-164
PDGFRB	-0.646	2.51E-13	-0.532	8.33E-10
PLAUR	-0.617	4.58E-20	-0.438	4.58E-15
PDGFA	-0.595	1.30E-04	-0.547	1.06E-03
THBS1	-0.547	2.07E-18	-0.367	3.52E-08
PLAU	-0.482	5.65E-26	-0.339	5.04E-24
<b>Anti-apoptotic factors</b>				
BCL2A1	-1.018	1.96E-02	-0.674	1.54E-01
BCL2L1	-0.330	1.22E-11	-0.259	1.12E-07
XIAP	-0.253	7.47E-03	-0.257	1.87E-02
<b>cell cycle and DNA damage</b>				
PRKD1	-0.626	1.09E-05	-0.425	1.33E-03
XRCC4	-0.571	4.31E-07	-0.310	1.18E-02
ATRNB	-0.517	1.11E-12	-0.498	4.46E-18
ATRNB	-0.493	5.24E-10	-0.418	3.66E-07
CCND1	-0.461	5.18E-26	-0.322	2.08E-18
PRKDC	-0.452	3.20E-10	-0.370	1.03E-08
ERCC6	-0.445	6.87E-04	-0.330	1.55E-02
PRKD2	-0.435	1.19E-05	-0.291	9.71E-03
<b>Invasion and metastasis</b>				
CDH4*	-2.856	9.15E-22	-2.572	1.01E-22
MM14	-1.233	5.2E-134	-0.921	1.91E-71
ITGA5	-0.678	3.12E-95	-0.482	8.39E-70
MMP16	-0.405	4.65E-03	-0.393	3.61E-03
MMP2	-0.398	1.38E-32	-0.264	2.03E-15
<b>Transporters and channels</b>				
ABCC1	-0.979	2.06E-22	-0.720	1.31E-22
KCNMA1	-0.525	3.83E-17	-0.336	1.24E-07

**Figure 8.** Signaling pathways altered by the treatment with free and nanocarrier delivered MTM. RNAseq data were used to perform gene ontology analyses. (A-B) KEGG pathway analysis showing the pathways significantly altered (enrichment score (ES)  $\leq -0.5$  or  $\geq 0.5$  and  $p_{adj} < 0.01$ ; blue circles) when comparing M\_F vs control (A) and M\_NP vs control (B). Circle diameter for each pathway reflect the number of genes involved in the pathway (gene count) showing altered expression. Information for relevant upregulated (purple text) or downregulated (green text) pathways is displayed. (C) GSEA analysis of selected signaling pathways in M\_F vs control (left) and M\_NP vs control (right) comparisons. (D) Fold change expression (expressed as Log<sub>2</sub>-FC) and  $p_{adj}$  values obtained in the indicated comparisons for a panel genes known to be regulated by SP1. (\* Several cadherins have been described to be targets of SP1, although CDH4 has not been described yet as a SP1-regulated gene).





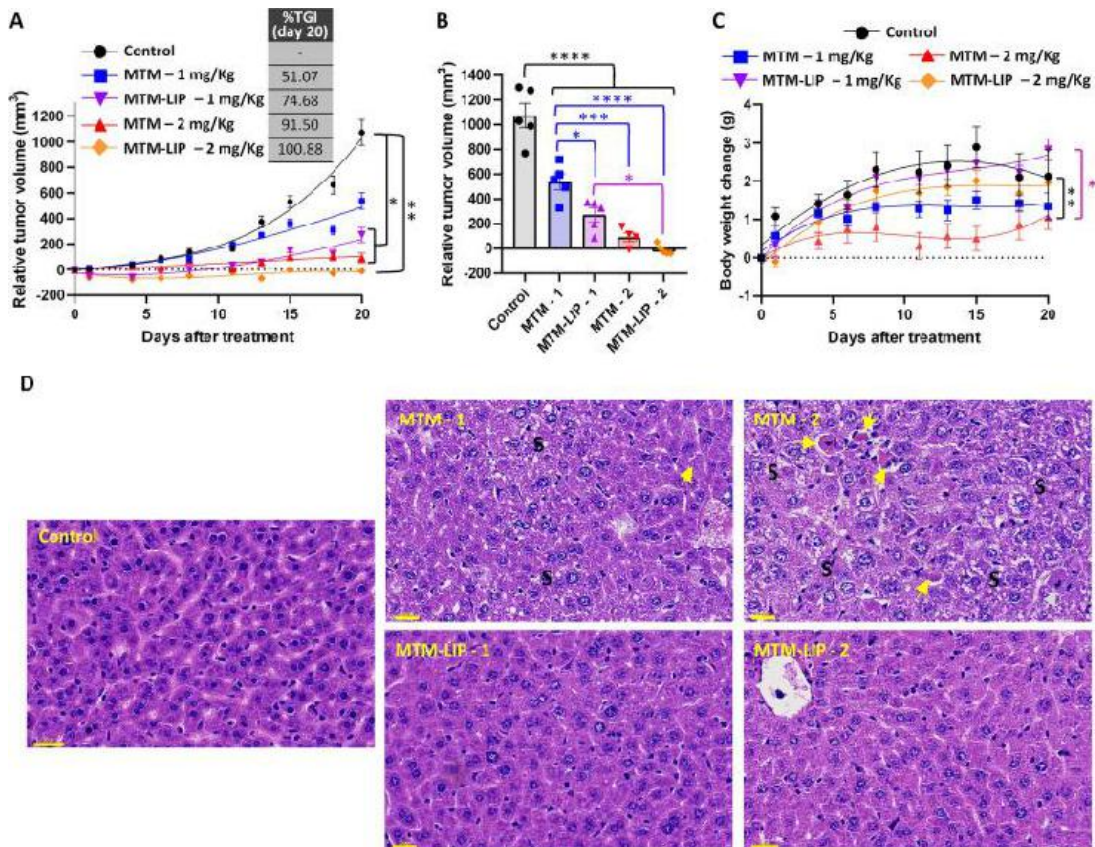


**Fig 9.** Inhibition of SP1 signaling by free and nanocarrier delivered MTM. (A) Western blotting analyses of SP1 and several SP1 downstream targets in T-5H-FC#1 cells treated with 0.1 μM free MTM or MTM-loaded nanoparticles for the indicated times. A control of a 48 hours-treatment with empty nanoparticles (Ce) for each formulation is included. (B-C) Western blotting analyses of SP1-related factors in T-5H-FC#1 (B) and T-CDS-17#4 cells (C) treated with the indicated concentrations of the different MTM formulations for 48 hours. β-Actin levels were used as loading controls.

### ***In vivo* antitumour activity of free and encapsulated MTM.**

Finally, to test whether the encapsulation of MTM may result in increased *in vivo* efficacy and safety of this drug, we treated immunodeficient mice carrying T-5H-FC#1 cells with free MTM or MTM-LIP. Two different doses (1 and 2 mg/Kg) of MTM-LIP demonstrated a greater ability to reduce tumour growth than equal doses of free MTM. The MTM-LIP - 1 mg/Kg group, but not the free MTM - 1 mg/Kg series, showed a significantly different tumour growth curve than the control series. Likewise, the difference between control and MTM-LIP - 2 mg/Kg series was more significant than that observed between control and free MTM - 2 mg/Kg groups (**Figure 10A**). At the experimental end-point (day 20 after the start of treatment), we also found that tumours treated with 1 mg/Kg MTM-LIP were significantly smaller than those treated with an equal dose of free MTM (**Figure 10B**). In addition, we observed a more favorable values of TGI when mice were treated with MTM-LIP. Thus, %TGI were 51.07 and 74.68 for the groups treated with 1 mg/Kg of free MTM and MTM-LIP respectively and 91.50 and 100.8 for groups treated with 2 mg/Kg of free MTM and MTM-LIP respectively (**Figure 10A**).

We have not found deaths or loss of body weight in any of the groups; however, the groups treated with free MTM gained weight at lower rates than those treated with equivalent doses of MTM-LIP. Thus, the body change curve of mice treated with free MTM - 2 mg/Kg, but not that of those treated with MTM-LIP - 2 mg/Kg, was significantly different from the curve of control mice (**Figure 10C**). In accordance with this observation, the histopathological examination of livers extracted from all the mice of the MTM - 2 mg/Kg group showed a high level of lipid accumulation (microvesicular steatosis), accompanied by the presence of localized hepatocellular necrosis. Intriguingly, one of the samples of this group also presented an unusually high number of mitosis. This pattern of toxicity was also observed at lower levels in all livers of the MTM - 1 mg/Kg group. On the other hand, none of the livers from the MTM-LIP - 1 mg/Kg showed signs of hepatotoxicity and only two of samples from the MTM-LIP - 2 mg/Kg group presented low levels of steatosis or occasional necrotic cells (**Figure 10 D**).



**Figure 10.** *In vivo* effect of free MTM and MTM-LIP. T-5H-FC#1 established xenografts were randomly assigned to five different groups (n=5 per group) and treated intravenous with vehicle (PBS, control), free MTM at 1 or 2 mg/kg or MTM-LIP at 1 or 2 mg/KG every 3-4 days (twice a week). (A) Curves representing the mean relative tumour volume of T-5H-FC#1 xenografts during the treatments. Drug efficacy expressed as the percentage of TGI is indicated. (B) Distribution of tumour volumes at the end of the experiment (day 20 after the start of the treatment). (C) Change in the body weights of mice during the treatments. (D) H&E staining of formalin-fixed paraffin embedded livers extracted at the experimental end-point. Areas presenting microvesicular steatosis (S), necrotic cells (yellow arrows) and mitosis (grey arrows) are indicated. Error bars represent the SEM and asterisks indicate statistically significant differences between groups in one-way ANOVA Turkey's tests (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01; \*\*\*:p<0.001; \*\*\*\*:p<0.001).

In sum, this data indicate that MTM-LIP is more efficient and tolerable than equal doses of free MTM. Indeed, the treatment with 2 mg/Kg MTM-LIP was able to produce tumour regression in the T-5H-FC#1 sarcoma model without observing severe adverse effects in mice.

## DISCUSSION

Over 15% of all pediatric solid malignant cancers are sarcomas [21]. The variety of subtypes of sarcomas and the rarity of the disease render them a very complex oncology entity to study. Very few effective and approved agents for the treatment of sarcomas exist. Chemotherapeutic drugs like doxorubicin or ifosfamide, alone or the combination thereof, constitute the main first-line systemic therapeutic option for patients suffering from sarcoma. In this context, the prognosis of advanced sarcoma patients is still unfavorable. Several promising drugs, including immunotherapy, kinase inhibitors or epigenetic modulators, among others, are therapeutic avenues currently undergoing study within ongoing clinical trials [21]. Among these strategies, the repurpose of drugs that have demonstrated anti-tumour efficacy in the past, also merits consideration. In this regard, MTM is a natural product approved by the FDA since 1970s that has been used clinically for the treatment of testicular carcinoma, glioblastomas and Ewing sarcoma [2-4]. However, gastrointestinal, hepatic, kidney and bone toxicity limited its widespread clinical implementation [9, 10]. Several strategies have been followed to take advantage of MTM anti-tumour properties while improving its toxicity profile. First, several analogues of MTM, such as EC-8042, have been reported to enhance its pharmacological profile while retaining a strong anti-tumour effect in sarcomas and other types of tumours [6, 8, 11, 12, 37, 39]. On the other hand, the

use of nanotechnology holds great promise for improving drug bioavailability minimizing toxicity from systemic exposure. The extended release of MTM from nanodevice systems could result in augmenting its therapeutic index, and improving several PK properties such as circulation time, metabolism or biodistribution. These facts may open the door for its evaluation in solid tumours.

The generation of MTM delivery systems is an interesting challenge due to its amphiphilic nature. MTM is highly soluble in water which causes its escape to the external aqueous phase, but it has a tricyclic aromatic polyketide moiety which give it solubility to some extent in several organic solvents, including dimethylsulfoxide or methanol. In this sense, herein different devices were explored to entrap MTM. Polymeric NPs are widely used as carriers for lipophilic drugs, since they can avoid renal clearance, circulate in the body for a prolonged time and accumulate in the tumour through the enhanced permeability and retention effect. Hydrogels are drug delivery systems mainly designed for the entrapment of hydrophilic drugs, whereas liposomes are systems to encapsulate drugs in the aqueous reservoir (hydrophilic drugs) or entrap them in the lipid bilayer (hydrophobic drugs). PLA were used as raw material for the generation of the polymeric NPs since it is approved by the FDA and is biodegradable and biocompatible. The hydrogelator was selected for entrapping MTM because it possesses a significant low minimum gelation concentration and allow fine-tuning of pH. Finally, a liposomal MTM formulation is reported based on the MTM encapsulation efficiency and the physical and chemical stabilities obtained. To the best of our knowledge, PLA and HG have never been previously reported as raw materials for the generation of MTM delivery systems. As a proof of concept, we have very recently encapsulated MTM in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) micelles and transfersomes [40]. However, the unfavorable high size PLGA micelles and the high PDI transfersomes encourage us to explore other nanodevice platforms for encapsulation.

MTM-NPs were obtained by the nanoprecipitation method. PLA was dissolved in a semipolar water miscible organic solvent, such as acetone and the NPs were formed after injection of the PLA solution into an aqueous phase. This methodology produced MTM-NPS with an optimal size, low polydispersity and a prominent encapsulation efficiency. When compared to the MTM entrapment in PLGA NPs, similar values in terms of size, narrow size distribution, and Z-potential were obtained [16]. In other work, MTM-NPs obtained using a single-emulsion solvent evaporation method with pegylated PGLA and

after filtration gave rise to smaller NPs of <25 nm in average size [17]. Also using the emulsion solvent evaporation method, we previously generated MTM-PLGA micelles with a greater size of around 220 nm [40]. However, the micellization procedure can be unfavorable for drug delivery. The disassembly of micelles may cause the abrupt release of the drugs. Concerning the generation of MTM-HG, MTM was entrapped during the network fibrillation process in a passive loading and the gels were obtained by the slow acidification produced by the hydrolysis of GL [30]. The HG was stable at temperatures above the boiling point of water. Finally, in this work we successfully obtained liposomal formulations by the ethanol injection and evaporation solvent method and using miglyol and pluronic F-127 as surfactants. These NPs displayed sizes and PDI values much lower than those obtained using thin film hydration or the ethanol injection method to generate transfersomes [40].

Stability studies showed high stability over time for the three formulations. However, different *in vitro* release patterns of MTM were observed for the different nanocarriers at pH 7.4. MTM-NPs showed an exponential release profile with an initial burst release no higher than 15%. MTM-NPs sustained a drug release profile over time, achieving the release of the MTM driven by diffusion after 24 hours, in contrast with MTM-LIP whose release was slowed down after 8 hours. The release of the MTM from MTM-HG was very fast, with a full release of MTM after 30 min. This burst release from HG has been previously described and may be better controlled through the combination of HG with other polymeric materials [41]. In any case, those nanoparticles showing more rapid release profiles, such as HG, may be suitable for local administration, while those nanodelivery systems with more controlled release, such as MTM-NPs or MTM-LIP, may be appropriate for systemic treatments [41].

In this work, we assayed the ability of our MTM nano-delivery systems to target different models of myxoid liposarcoma, undifferentiated pleomorphic sarcoma and chondrosarcoma. We show that all MTM-loaded nanocarriers retain the ability of free MTM to inhibit proliferation and invasion at nanomolar concentrations. As proof in favor of the safe use of these devices, we also show that the empty nanocarriers did not show any toxicity at any assayed concentration. More relevantly, we found that *in vivo* administration of MTM entrapped in liposomes resulted in a highly effective and dose-dependent antitumour response of sarcoma xenografts, which achieved tumour regression after the treatment with a dose of 2 mg/Kg MTM-LIP. Importantly, encapsulated MTM exhibited significantly enhanced therapeutic effects on these xenografts as compared with free MTM. Moreover, *in*

*in vivo* nanodelivery of MTM is able to highly reduce the toxicity effects of this drug at concentrations that demonstrated a high antitumour activity against sarcomas. In line with this results, MTM encapsulated in two different types of polymeric nanoparticles, PLGA and poly-ursolic acid, also demonstrated a higher anti-tumour activity than free MTM in a pancreatic cancer model and a colon cancer model respectively [17, 42]. Nevertheless, the doses of free MTM assayed in these works was not sufficient to produce histological damage and therefore our study is the first demonstrating a safer profile for encapsulated MTM.

A relevant antitumour feature of MTM is the ability to downregulate the expression of genes associated with the CSC phenotype and to target CSC subpopulations, as reported for glioblastoma [28], medulloblastoma [29], cervical cancer [26] and colon cancer [27]. Here we assessed the effect of MTM in stemness using two different functional methods associated to the clonogenic potential of tumour cells (tumoursphere growth) and to transcriptional activity of pluripotency factors (SOX2 activity). Our results expand the spectrum of tumours responding to the anti-stemness activity of MTM to sarcomas and also confirm that the MTM-delivering devices described here keep the anti-stemness potential of free MTM. This ability of MTM to target CSCs in sarcomas is in line with our previous work showing that the MTM analogue EC-8042 was able to inhibit CSC-associated gene expression in the same models used in this work and to target CSCs most efficiently than other drugs used to treat sarcomas [12, 25].

The effects of encapsulated MTM on gene expression had not been reported yet. In agreement with the similar *in vitro* antitumour activity of free and encapsulated MTM, RNA sequencing analyses showed that myxoid liposarcoma cells treated with either MTM-NPs or free MTM underwent a similar transcriptomic dysregulation process. In both cases, we observed a robust pattern of transcriptional repression leading to the inhibition of relevant cancer-related pathways like ECM receptor interaction, focal adhesion, mTOR signaling, VEGF signaling, ERBB signaling, TGF $\beta$  signaling or WNT signalling. This pattern of gene expression inhibition is in line with the ability of MTM to bind GC-rich sequences of the DNA, thus preventing the access of relevant transcription factor to their promoters and blocking the expression of downstream targets. Among those transcription factors inhibited by MTM, SP1 is the most widely described [6, 38, 43]. Indeed, we found that the treatment of sarcoma cells with both free and encapsulated MTM resulted in the inhibition of a wide array of SP1 downstream targets. Relevantly, many of these SP1-regulated factors, including

VEGFA, TFGFB, mTOR, EGFR, cMYC, ABCC1 or ITGA5, are key factors of the signalling pathways above described to be the most deeply inhibited by MTM. Among other factors commonly downregulated after treatment with MTM or MTM-NPs (Tables S1 and S2), NTKR3 is known to be part of different oncogenic gene fusions in sarcomas and is being investigated as potential therapeutic target [44, 45]. Besides, CDH4 has been recently found to be overexpressed and to play key pro-tumour roles in osteosarcoma [46]. Altogether, these data suggest that MTM may act as multi-repressor agent able to inhibit the activation of several tumour-promoting pathways at once.

## **CONCLUSIONS**

The use of MTM delivery systems may offer a wide range of possibilities to overcome the multiple physiological barriers that must be overcome by MTM and improve its safety, specificity and efficiency. The results from this work confirm that MTM encapsulated in polymeric nanoparticles, liposomal formulations and hydrogels retain the ability of free MTM to repress the expression of relevant cancer-related pathways in sarcoma cells while improve its therapeutic efficacy and safety *in vivo*. Therefore, these novel formulations may represent an efficient and safer MTM-delivering alternative for sarcoma treatment.

## **AUTORSHIP CONTRIBUTIONS**

OE and EN: development of methodology, performance of experimental procedures, acquisition, analysis and interpretation of data. VR, JT, BG, PC, DHM, MRS, AVA and AR: performance of experimental procedures. FM: provision of key materials, analysis and interpretation of data and manuscript revision. AO, VBL and MVG: analysis and interpretation of data and manuscript revision. IB: conception and design, development of methodology, acquisition, analysis and interpretation of data and manuscript writing. CAM and RR: conception and design, analysis and interpretation of data, manuscript writing, supervision and financial support. All authors have read and approved the manuscript.

## **ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE**

All experimental protocols have been performed in accordance with institutional review board guidelines and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Principado de Asturias (ref. 255/19) and the Animal Research Ethical Committee of the University of Oviedo (ref. PROAE 34-2019).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to AFANION for the “Mecenazgo Antonio Cepillo”. We also thank the Unidad de Prestación de Servicios IER-UCLM for providing access to electron microscopy facilities. Finally, we thank Cristina Martin (Flow Cytometry Unit, ISPA) for her assistance in flow cytometry analyses.

## REFERENCES

1. Perlia cp, gubisch nj, wolter j, edelberg d, dederick mm,taylor sg, 3rd. Mithramycin treatment of hypercalcemia. *Cancer*. 1970;25(2):389-94.
2. Grohar pj, woldemichael gm, griffin lb, mendoza a, chen qr, yeung c, et al. Identification of an inhibitor of the ewe-fli1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J natl cancer inst*. 2011;103(12):962-78.
3. Kennedy bj,torkelson jl. Long-term follow-up of stage iii testicular carcinoma treated with mithramycin (plicamycin). *Med pediater oncol*. 1995;24(5):327-8.
4. Kofman s, perlia cp,economou sg. Mithramycin in the treatment of metastatic ewing's sarcoma. *Cancer*. 1973;31(4):889-93.
5. Miller dm, polansky da, thomas sd, ray r, campbell vw, sanchez j, et al. Mithramycin selectively inhibits transcription of g-c containing dna. *Am j med sci*. 1987;294(5):388-94.
6. Vizcaino c, mansilla s,portugal j. Sp1 transcription factor: a long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol ther*. 2015;152:111-24.
7. Hou c, rohr j, parkin s,tsodikov ov. How mithramycin stereochemistry dictates its structure and dna binding function. *Medchemcomm*. 2019;10(5):735-41.
8. Osgood cl, maloney n, kidd cg, kitchen-goosen s, segars l, gebregiorgis m, et al. Identification of mithramycin analogues with improved targeting of the ewe-fli1 transcription factor. *Clin cancer res*. 2016;22(16):4105-18.
9. Green l,donehower rc. Hepatic toxicity of low doses of mithramycin in hypercalcemia. *Cancer treat rep*. 1984;68(11):1379-81.



10. Monto rw, talley rw, caldwell mj, levin wc, guest mm. Observations on the mechanism of hemorrhagic toxicity in mithramycin (nsc 24559) therapy. *Cancer res.* 1969;29(3):697-704.
11. Pandiella a, moris f, ocana a, nunez le, montero jc. Antitumoural activity of the mithralog ec-8042 in triple negative breast cancer linked to cell cycle arrest in g2. *Oncotarget.* 2015;6(32):32856-67.
12. Tornin j, martinez-cruzado l, santos l, rodriguez a, nunez le, oro p, et al. Inhibition of sp1 by the mithramycin analog ec-8042 efficiently targets tumour initiating cells in sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(21):30935-50.
13. Mitchell mj, billingsley mm, haley rm, wechsler me, peppas na, langer r. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat rev drug discov.* 2021;20(2):101-24.
14. Frézard f, garnier-suillerot a, demicheli c. Encapsulation of mithramycin in liposomes in response to a transmembrane gradient of calcium ions. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry.* 1997;28(1):51-62.
15. Capretto l, mazzitelli s, brognara e, lampronti i, carugo d, hill m, et al. Mithramycin encapsulated in polymeric micelles by microfluidic technology as novel therapeutic protocol for beta-thalassemia. *Int j nanomedicine.* 2012;7:307-24.
16. Cohen-sela e, teitlboim s, chorny m, koroukhov n, danenberg hd, gao j, et al. Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in plga nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity. *J pharm sci.* 2009;98(4):1452-62.
17. Liu xj, li l, liu xj, li y, zhao cy, wang rq, et al. Mithramycin-loaded mpeg-plga nanoparticles exert potent antitumour efficacy against pancreatic carcinoma. *Int j nanomedicine.* 2017;12:5255-69.
18. Scott d, rohr j, bae y. Nanoparticulate formulations of mithramycin analogs for enhanced cytotoxicity. *Int j nanomedicine.* 2011;6:2757-67.
19. Hatina j, kripnerova m, houfkova k, pesta m, kuncova j, sana j, et al. Sarcoma stem cell heterogeneity. *Adv exp med biol.* 2019;1123:95-118.

20. Rodriguez r, rubio r,menendez p. Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell res.* 2012;22(1):62-77.
21. Grunewald tg, alonso m, avnet s, banito a, burdach s, cidre-aranaz f, et al. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *Embo mol med.* 2020;12(11):e11131.
22. Menendez st, gallego b, murillo d, rodriguez a,rodriguez r. Cancer stem cells as a source of drug resistance in bone sarcomas. *J clin med.* 2021;10(12).
23. Grohar pj, glod j, peer cj, sissung tm, arnaldez fi, long l, et al. A phase i/ii trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory ewing sarcoma and *ews-fli1* fusion transcript. *Cancer chemother pharmacol.* 2017;80(3):645-52.
24. Flores g, everett jh, boguslawski ea, oswald bm, madaj zb, beddows i, et al. Cdk9 blockade exploits context-dependent transcriptional changes to improve activity and limit toxicity of mithramycin for ewing sarcoma. *Mol cancer ther.* 2020;19(5):1183-96.
25. Menendez st, rey v, martinez-cruzado l, gonzalez mv, morales-molina a, santos l, et al. Sox2 expression and transcriptional activity identifies a subpopulation of cancer stem cells in sarcoma with prognostic implications. *Cancers (basel).* 2020;12(4).
26. Dong p, xiong y, hanley sjb, yue j,watari h. Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced mir-143 and mir-107 activation. *J exp clin cancer res.* 2017;36(1):150.
27. Quarni w, dutta r, green r, katiri s, patel b, mohapatra ss, et al. Mithramycin a inhibits colorectal cancer growth by targeting cancer stem cells. *Sci rep.* 2019;9(1):15202.
28. Singh dk, kollipara rk, vemireddy v, yang xl, sun y, regmi n, et al. Oncogenes activate an autonomous transcriptional regulatory circuit that drives glioblastoma. *Cell rep.* 2017;18(4):961-76.
29. Vanner rj, remke m, gallo m, selvadurai hj, coutinho f, lee l, et al. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer cell.* 2014;26(1):33-47.

30. Rodriguez-llansola f, escuder b, miravet jf, hermida-merino d, hamley iw, cardin cj, et al. Selective and highly efficient dye scavenging by a ph-responsive molecular hydrogelator. *Chem commun (camb)*. 2010;46(42):7960-2.
31. Cimas fj, niza e, juan a, noblejas-lopez mdm, bravo i, lara-sanchez a, et al. Controlled delivery of bet-protacs: *in vitro* evaluation of mz1-loaded polymeric antibody conjugated nanoparticles in breast cancer. *Pharmaceutics*. 2020;12(10).
32. Farzaneh h, ebrahimi nik m, mashreghi m, saberi z, jaafari mr,teymouri m. A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: from liposomal preparation to therapy. *International journal of pharmaceutics*. 2018;551(1):300-08.
33. Sala m, miladi k, agusti g, elaissari a,fessi h. Preparation of liposomes: a comparative study between the double solvent displacement and the conventional ethanol injection— from laboratory scale to large scale. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*. 2017;524:71-78.
34. Giacomelli fc, stepanek p, schmidt v, jager e, jager a,giacomelli c. Light scattering evidence of selective protein fouling on biocompatible block copolymer micelles. *Nanoscale*. 2012;4(15):4504-14.
35. Martinez-cruzado l, tornin j, santos l, rodriguez a, garcia-castro j, moris f, et al. Aldh1 expression and activity increase during tumour evolution in sarcoma cancer stem cell populations. *Sci rep*. 2016;6:27878.
36. Tang b, raviv a, esposito d, flanders kc, daniel c, nghiem bt, et al. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. *Stem cell reports*. 2015;4(1):155-69.
37. Hermida-prado f, villaronga ma, granda-diaz r, del-rio-ibisate n, santos l, hermosilla ma, et al. The src inhibitor dasatinib induces stem cell-like properties in head and neck cancer cells that are effectively counteracted by the mithralog ec-8042. *J clin med*. 2019;8(8).
38. Beishline k,azizkhan-clifford j. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *Febs j*. 2015;282(2):224-58.

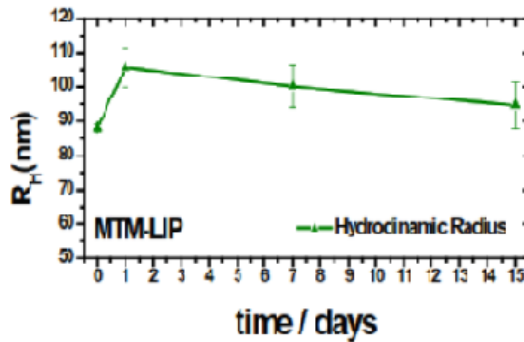
39. Shinde d, albino d, zoma m, mutti a, mapelli sn, civenni g, et al. Transcriptional reprogramming and inhibition of tumour-propagating stem-like cells by ec-8042 in erg-positive prostate cancer. *Eur urol oncol.* 2019;2(4):415-24.
40. Estupiñán o, rendueles c, suarez p, rey v, murillo d, moris f, et al. Nanoencapsulation of mithramycin in transfersomes and pol-ymeric micelles for the treatment of sarcomas. *Journal of clinical medicine.* 2021;in press.
41. Gao w, zhang y, zhang q,zhang l. Nanoparticle-hydrogel: a hybrid biomaterial system for localized drug delivery. *Ann biomed eng.* 2016;44(6):2049-61.
42. Hassanzadeh p, arbabi e,rostami f. Development of a novel nanoformulation against the colorectal cancer. *Life sci.* 2021;281:119772.
43. Choi es, nam js, jung jy, cho np,cho sd. Modulation of specificity protein 1 by mithramycin a as a novel therapeutic strategy for cervical cancer. *Sci rep.* 2014;4:7162.
44. Miettinen m, felisiak-golabek a, luina contreras a, glod j, kaplan rn, killian jk, et al. New fusion sarcomas: histopathology and clinical significance of selected entities. *Hum pathol.* 2019;86:57-65.
45. Shi e, chmielecki j, tang cm, wang k, heinrich mc, kang g, et al. Fgfr1 and ntrk3 actionable alterations in "wild-type" gastrointestinal stromal tumours. *J transl med.* 2016;14(1):339.
46. Tang q, lu j, zou c, shao y, chen y, narala s, et al. Cdh4 is a novel determinant of osteosarcoma tumourigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2018;37(27):3617-30.
47. Sanchez-barba lf, alonso-moreno c, garces a, fajardo m, fernandez-baeza j, otero a, et al. Synthesis, structures and ring-opening polymerization studies of new zinc chloride and amide complexes supported by amidinate heteroscorpionate ligands. *Dalton trans.* 2009(38):8054-62.
48. Alonso-moreno c, garcés a, sánchez-barba lf, fajardo m, fernández-baeza j, otero a, et al. Discrete heteroscorpionate lithium and zinc alkyl complexes. Synthesis, structural studies, and rop of cyclic esters. *Organometallics.* 2008;27(6):1310-21.

49. Novakova r, nunez le, homerova d, knirschova r, feckova l, rezuchova b, et al. Increased heterologous production of the antitumoural polyketide mithramycin a by engineered streptomyces lividans tk24 strains. *Appl microbiol biotechnol.* 2018;102(2):857-69.
50. Funes jm, quintero m, henderson s, martinez d, qureshi u, westwood c, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc natl acad sci u s a.* 2007;104(15):6223-8.
51. Rodriguez r, rosu-myles m, arauzo-bravo m, horrillo a, pan q, gonzalez-rey e, et al. Human bone marrow stromal cells lose immunosuppressive and anti-inflammatory properties upon oncogenic transformation. *Stem cell reports.* 2014;3(4):606-19.
52. Rodriguez r, tornin j, suarez c, astudillo a, rubio r, yauk c, et al. Expression of fus-chop fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem cells.* 2013;31(10):2061-72.
53. Rey v, menendez st, estupinan o, rodriguez a, santos l, tornin j, et al. New chondrosarcoma cell lines with preserved stem cell properties to study the genomic drift during *in vitro/in vivo* growth. *J clin med.* 2019;8(4).
54. Rodriguez r, hansen lt, phear g, scorah j, spang-thomsen m, cox a, et al. Thymidine selectively enhances growth suppressive effects of camptothecin/irinotecan in msi+ cells and tumours containing a mutation of mre11. *Clin cancer res.* 2008;14(17):5476-83.
55. Martinez-cruzado l, tornin j, rodriguez a, santos l, allonca e, fernandez-garcia mt, et al. Trabectedin and camptothecin synergistically eliminate cancer stem cells in cell-of-origin sarcoma models. *Neoplasia.* 2017;19(6):460-70.
56. Tornin j, hermida-prado f, padda rs, gonzalez mv, alvarez-fernandez c, rey v, et al. Fus-chop promotes invasion in myxoid liposarcoma through a src/fak/rho/rock-dependent pathway. *Neoplasia.* 2018;20(1):44-56.
57. Zuazua-villar p, rodriguez r, gagou me, eyers pa, meuth m. Dna replication stress in chk1-depleted tumour cells triggers premature (s-phase) mitosis through inappropriate activation of aurora kinase b. *Cell death dis.* 2014;5:e1253.

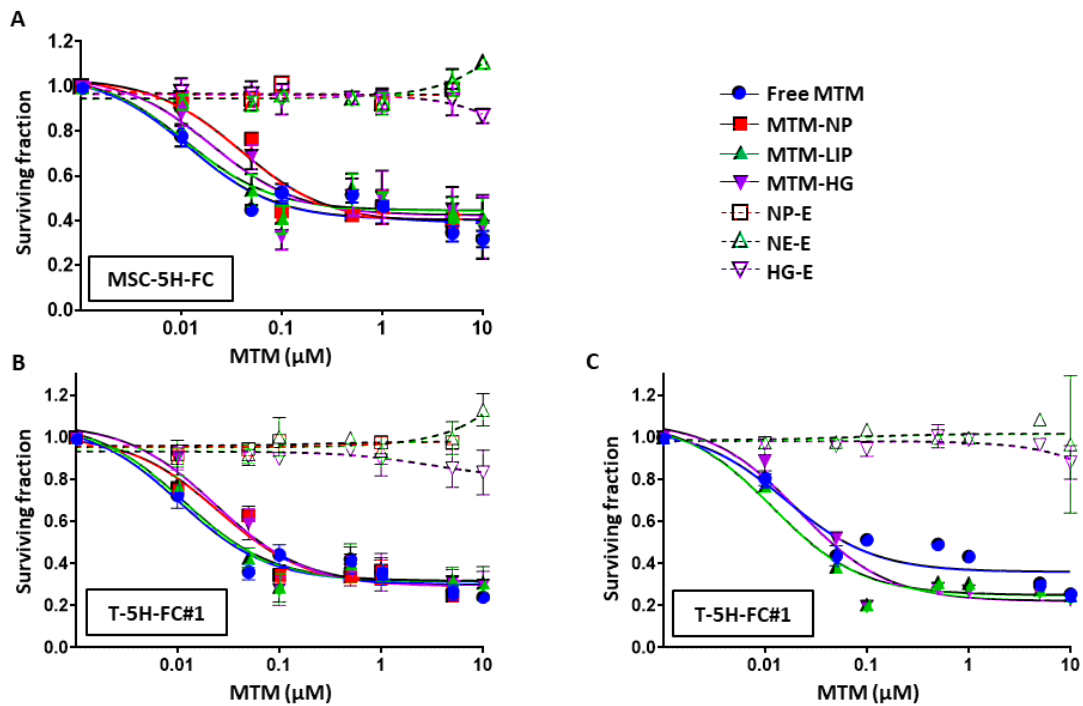
58. Estupinan o, santos l, rodriguez a, fernandez-nevado l, costales p, perez-escuredo j, et al. The multikinase inhibitor ec-70124 synergistically increased the antitumour activity of doxorubicin in sarcomas. *Int j cancer*. 2019;145(1):254-66.

59. Rubio r, abarrategi a, garcia-castro j, martinez-cruzado l, suarez c, tornin j, et al. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2014;32(5):1136-48.

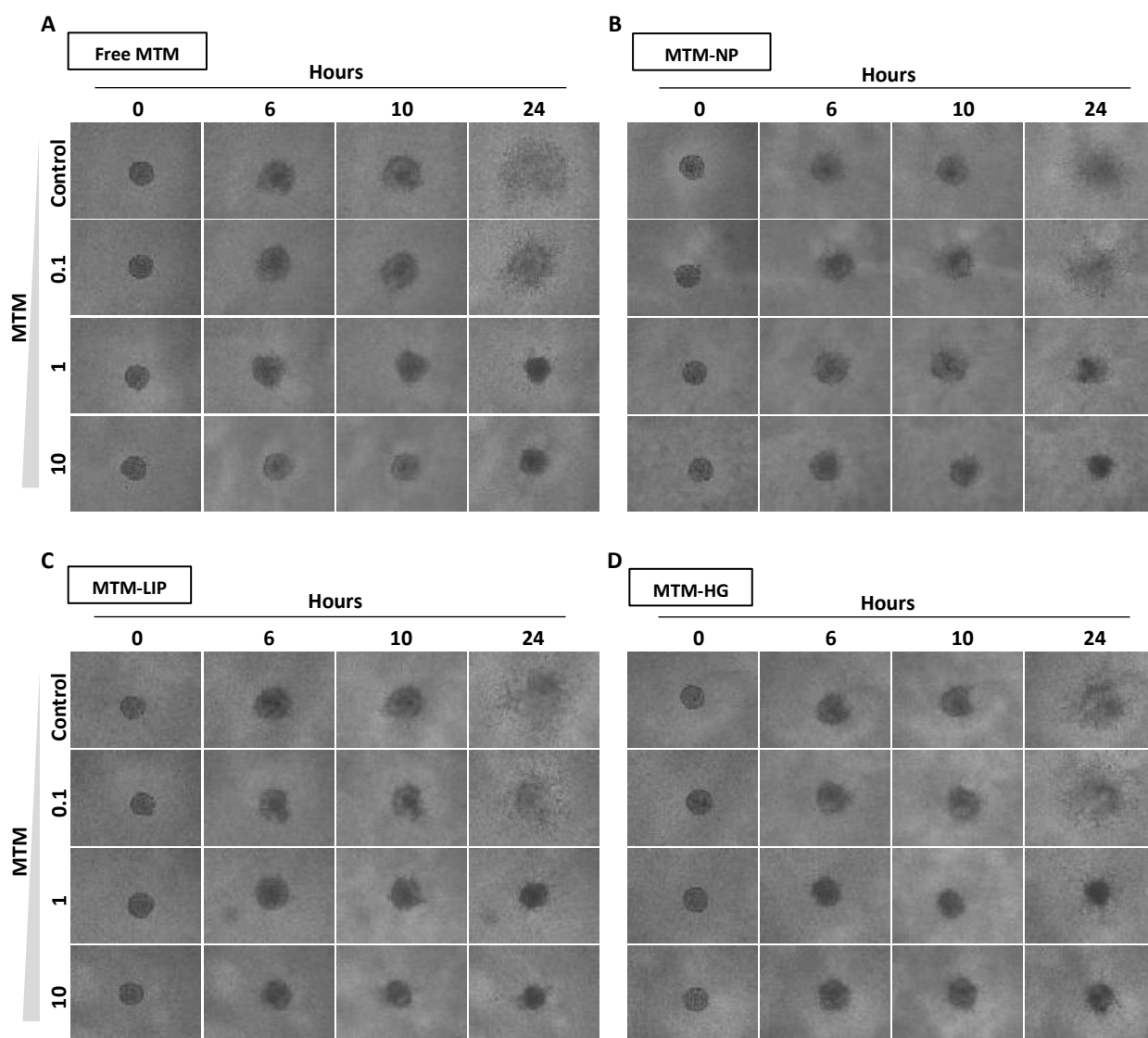
## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Figure S1:** Stability of MTM-LIP nanovesicles in human blood plasma. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments

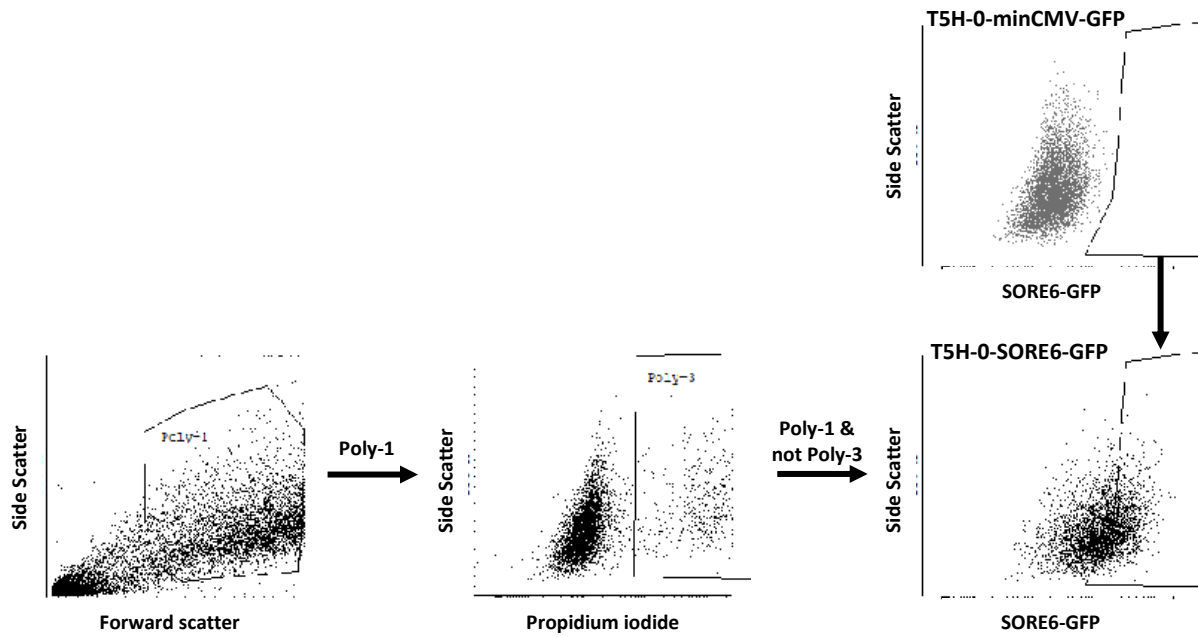


**Figure S2.** Antiproliferative effects induced by encapsulated MTM and empty nanoparticles in myxoid liposarcoma models. (A-B) Cell viability measured after the treatment of the myxoid liposarcoma models MSC-5H-FC (A) and T-5H-FC#5 (B) with increasing concentrations of free MTM or MTM encapsulated in polymeric nanoparticles (MTM-NP), nano-emulsions (MTM-LIP) and Hidrogels (MTM-HG) for 48 hours. The effect of the corresponding amounts of empty nanoparticles (NP-E, NE-E and HG-E) are also shown. (C) Cell viability measured after the treatment of T-5H-FC#1 cells for 48 hours with free-MTM, MTM-LIP, MTM-HG, NE-E and HG-E kept at 4°C for 14 days.



**Figure S3.** Invasion ability of free and encapsulated MTM-treated sarcoma cells. Representative images of the 3D spheroids treated with the indicated concentrations free MTM (A), MTM-NP (B), MTM-LIP (C), and MTM-HG (D) for the indicated times.





**Figure S4.** Gating strategy used to analyze SORE6-GFP activity. Cells positive for propidium iodide ( $0.5\mu\text{g/ml}$ ) staining were excluded from the analysis and control T-5H-O-minCMV-GFP cells were used as negative control for SORE6-GFP gating.

### **2.3 Objetivo 3: Estudio de la capacidad del mitrólogo EC-8042 para erradicar las subpoblaciones de células madre tumorales en osteosarcomas.**

i) Caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la actividad antineoplásica del EC-8042 en sarcomas en comparación con la MTM; ii) Análisis del efecto del EC-8042 contra subpoblaciones CSCs en osteosarcomas; iii) Evaluación de la importancia de la ruta de señalización NOTCH1 en el desarrollo neoplásico en osteosarcomas; iv) Identificación del papel que juega la inhibición de NOTCH1 en la actividad del EC-8042 contra subpoblaciones CSCs en osteosarcomas.

**2.3.1. Artículo 4:** The anti-stemness activity of the mithramycin analog EC-8042 in osteosarcoma is mediated by its activity as multi-target inhibitor of NOTCH1 signalling.

**THE ANTI-STEMNESS ACTIVITY OF THE MITHRAMYCIN ANALOG EC-8042  
IN OSTEOSARCOMA IS MEDIATED BY ITS ACTIVITY AS MULTI-TARGET  
INHIBITOR OF NOTCH1 SIGNALING.**

Óscar Estupiñán<sup>1,2,3</sup> *et al.*

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n 33011 Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain. <sup>3</sup>CIBER en oncología (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain.

**ABSTRACT**

Sarcomas comprise a heterogeneous group of malignant neoplasms that are frequently associated to a poor prognosis and a modest response to current treatments. EC-8042 is a well-tolerated mithramycin analog that has demonstrated an efficient ability to eliminate tumor cells, including cancer stem cell subpopulations (CSC), in sarcomas. To gain insight about specific molecular mechanisms mediating the antitumor activity of EC-8042, we performed a transcriptome analysis of soft tissue sarcoma and osteosarcoma cells treated with EC-8042 and/or mithramycin. Using the respective IC<sub>50</sub> concentrations, we found that EC-8042 produces a more profound modulation of gene expression than mithramycin. Among the signaling specifically altered by EC8042, we found that the active form of NOTCH1 and several downstream effectors and targets of this pathway were effectively inhibited by this drug in a panel of osteosarcoma cell lines. Overexpression of NOTCH1 cDNA in osteosarcoma cells resulted in a reduced anti-tumor effect of EC-8042 in CSC-enriched 3D tumorspheres cultures. Moreover, NOTCH1 overexpressing cells displayed a higher recovery potential after the treatment. On the other hand, the depletion of the NOTCH1 downstream target HES1, was able to enhance the action of EC-8042 on CSCs, such that osteosarcoma cells failed to recover after treatment withdrawal. Gain and loss of function experiments also demonstrated that HES1 depleted cells showed reduced tumor growth potential *in vivo*. Furthermore, mice xenografted with NOTCH1 overexpressing cell

responded worse than parental cells to EC-8042. Finally, we found that active NOTCH1 expression in sarcoma patients was associated to a higher tumor grade, a lower differentiation, an increased invasive potential and a lower patient survival. Overall, this data highlights the relevant role that NOTCH1 signaling plays in mediating stemness in osteosarcoma. Moreover, we demonstrate that EC-8042 is powerful inhibitor of NOTCH signaling and that the anti-CSC activity of this mithramycin analog highly rely on its ability to repress this pathway.

**Keywords:** Osteosarcoma, cancer stem cells, EC-8042, mithramycin, RNAseq, NOTCH1, HES1.

**Correspondence to:** Rene Rodriguez, PhD. Sarcomas and Experimental Therapeutics Lab., Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Av. de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain. Phone: +34985101399. Email: rene.rodriguez@ispasturias.es

## INTRODUCTION

Sarcomas comprise a heterogeneous set of rare neoplastic pathologies derived from mesenchymal stem cells (MSC). Among those sarcomas arising in bones, osteosarcomas are vascularized neoplasms characterized by the generation of an immature osteoid matrix and constitute the most common type of primary bone cancer [1, 2]. With a higher incidence in early ages, osteosarcomas involve a 2-3% of all pediatric malignant neoplasms [3]. In general terms, osteosarcomas are considered high-grade tumors because of its elevated metastatic potential [4]. Treatment of these neoplasms is currently based on the surgical removal of the primary tumor with wide-margin resection, with or without combinatory (neo)-adjuvant chemotherapy (commonly doxorubicin, ifosfamide and cisplatin with or without methotrexate at high doses) or radiation therapy [2, 4, 5]. Although localized tumors generally respond well to conventional treatments, a high proportion of cases eventually relapse and / or develop metastases, leading to overall survival rates that have remained below 50% and unchanged throughout of the last decades [2, 6]. The frequent appearance of clones of tumor cells that acquire resistance to current therapies, may be in part explained by the emergence of subsets of tumor cells presenting a stem cell-like phenotype. This Cancer Stem Cells (CSCs) has been identified and characterized in many tumors including osteosarcomas and has been widely associated with drug resistance, tumor relapses and

metastasis development [7-10]. Therefore, finding new treatments able to eliminate CSC subpopulations must become a top priority objective in order to achieve a complete eradication of osteosarcomas.

Different signaling pathways are known to mediate stemness both in normal stem cells and CSCs. Among them, NOTCH pathway plays relevant roles in cell fate determination, differentiation and survival in development and tissue homeostasis [11, 12]. This highly evolutionally conserved pathway is initiated by the binding of different Jagged (Jagged-1 and Jagged-2) or Delta-like (DLL1, DLL3 and DLL4) ligands to a family of 4 transmembrane receptors (NOTCH1-4 in humans). This receptor-ligand interaction induces sequential cleavages of the NOTCH receptor, mediated by different metalloproteases and gamma-secretases, which produce the release of the NOTCH intracellular domain (NICD) in the signal-receiving cell. Subsequently, NICD translocate to the nucleus and together with the RBPJ transcription factor and other transcriptional co-activators, such as mastermind-like factors (MANL), form an active transcriptional complex which direct the expression of target genes such as those coding for Hairy Enhancer of Split (HES) proteins, HES related proteins (HEY), CCND1 or C-MYC [13]. In relation with its roles in carcinogenesis and cancer progression, NOTCH signaling, has been reported to act both as a tumor promoter or suppressor depending on tissue and microenvironment-dependent factors [14-16].. On one hand, altered expression and activation of NOTCH1 signaling have been associated to tumor evolution and the maintenance of a stemness phenotype in many cancers including T-cell acute lymphoblastic leukemia [17], glioblastoma [18], soft tissue sarcomas [19], breast cancer [20, 21], and prostate cancer [22]. On the other hand, the expression of NOTCH1 has been associated to a better prognostic in head and neck squamous cell carcinomas [23] and loss function experiments of NOTCH signaling has revealed tumor suppressor roles in skin cancer and other tumor types [24]. In osteosarcomas, NOTCH signaling has been reported to play a key role in tumor development [25], tumor growth [26, 27], angiogenesis [28], metastasis [29], and the acquisition of drug resistance by CSCs subpopulations [30-32].

Mithramycin A (MTM), also known as Plicamycin, is a natural antitumoral antibiotic produced by *Streptomyces argillaceus* that binds preferentially to GC-rich sequences in DNA. By this mechanism, this drug blocks the binding of key oncogenic transcription factors, such as those of the SP family, to their promoters, thereby inhibiting the expression of their target genes [33, 34]. MTM shows a remarkable activity against various malignant

neoplasms. Nevertheless, this drug has been partially relegated out of clinical use because of its high toxicity, responsible of the appearance of severe side effects such as thrombocytopenia, hepatic necrosis and renal necrosis or hypocalcemia [35]. In recent years, interest in MTM has been renewed due to the discovery of new, more specific, mechanisms of action and synergistic combinations that may contribute to refocus its use clinical use. Thus, the ability of MTM to inhibit EWS-FLI-1 in addition to its synergistic interaction with CDK9 inhibitors promoted further studies to develop MTM-based therapies against Ewing sarcoma [36-38]. In addition, several studies have evidenced the powerful ability of MTM to target CSCs in many types of cancers [39-43]. To take advantage of these remarkable anti-tumor properties of mithramycin while minimizing its detrimental effects, two different strategies have been followed. The first one, rely in the use of nanocarriers as a way to increase the therapeutic window of MTM. Thus, our group has recently demonstrated that MTM encapsulated in liposomal formulations, polymeric nanoparticles or hydrogels exhibited enhanced therapeutic effects and was better tolerated than free MTM [44, 45]. The second strategy consists in the development of second-generation MTM analogs with improved safety profiles [46]. A leading MTM analog generated by genetic engineering of the MTM biosynthesis pathways is EC-8042 (demycarosyl-3D- $\beta$ -D-digitoxosyl-mithramycin SK) [47]. This compound has proven to be 10-fold less toxic than MTM [48] while showing a strong antitumor activity against Ewing Sarcoma [49], melanoma [50], ovarian cancer [51, 52] and breast cancer [53]. In addition, it has been reported that EC-8042 is able to efficiently target CSCs in sarcomas [7, 9], head and neck tumors [54], and ERG-positive prostate cancer [55].

Here we show that EC-8042 is an efficient multi-target repressor of NOTCH1 signalling in sarcomas. We generated gain and/or loss of function models of osteosarcoma to demonstrate that its ability to repress NOTCH signaling is a relevant anti-stemness mechanism of action of this MTM analog. Finally, we found that NOTCH1 expression was associated to a poorer outcome of sarcoma patients. Thus, the inhibition of NOTCH signaling with EC-8042 may represent an efficient therapeutic option to treat osteosarcomas.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture, drugs and ethics statement

Transformed bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cell (hBMSC) lines with expression of FUS-CHOP to generate a myxoid liposarcoma phenotype were previously generated and characterized [1]. Osteosarcomas cell lines Saos-2, MG63, U2OS and 143B were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). The patient-derived primary cell line OST-3 was generated as previously described [2].

The identity of all cell lines has been authenticated by Short Tandem Repeats analysis during the last 3 months. All the cell lines were tested for Mycoplasma monthly using the LONZA MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (LONZA, Rockland CE) and cultured as previously described [3, 4]. Sarcoma cell lines were stably modified to modulate the expression of NOTCH1 and HES1 by transduction with lentiviral particles obtained using a 3rd generation lentiviral packaging system and the following lentiviral vectors: 1) A lentiviral vector encoding the cDNA for the intracellular domain of NOTCH1 (N1ICD) (EF.v-CMV.GFP; Addgene, ref: 17623) was used to overexpress this factor and an empty vector (pWPI; Addgene, ref:12254) was used as control; 2) lentiviral vectors encoding human HES1-specific shRNAs (SMARTvector Lentiviral shRNA, Refs: V3SH11240-225656557 (D9) and V3SH11240-226832480 (D10); Horizon Discovery, Cambridge UK) were used to silence HES1 expression; and 3) A lentiviral empty vector(pWPI; Addgene, ref:12254) was used as transduction control. Cells expressing these lentiviral vectors, which were positive for the fluorescence marker GFP, were selected by flow cytometry using BD FACS Aria II Cell Sorter (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium).

EC-8042 and mithramycin (MTM) were synthesized using proprietary processes by EntreChem S.L. (Oviedo, Spain) [5]. Drug stocks were prepared as 10 mM solutions in sterile DMSO for *in vitro* experiments, maintained at -20°C, and brought to the final concentration just before use. For *in vivo* experiments, EC-8042 was prepared in sterile saline solution and administrated intravenously.

All experimental protocols have been performed in accordance with institutional review board guidelines, and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Principado de Asturias.

### **Tumorsphere culture**

Tumorsphere formation protocol and the analysis of the effects of drugs on tumorsphere formation ability were previously described [6, 7].

### **Cell viability assays**

The viability of cell lines after the exposition to different drug concentrations for 48 hour was determined using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) as described before [8]. The concentration of half-maximal inhibition of viability ( $IC_{50}$ ) for each treatment was determined by non-linear regression using GraphPad Prism version 8.0 (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA).

Alternatively, cytotoxic potential of treatment was tested in colony formation unit assays (CFU) as described previously [9]. In these assays, cells were exposed to 24h treatments and left to form colonies in drug free medium for 10 days. The surviving fraction was determined by dividing the average number of colonies for each treatment by the average number of colonies in the control.

### **Analysis of cell proliferation**

Real time cell proliferation was measured using a RTCA iCELLigence™ analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 10 000 cells/well of the different cell lines were added to 8-well E-plates (Agilent), which were then placed on the device station in a cell culture incubator (normoxia; 5% CO<sub>2</sub> at 37°C) for continuous recording of impedance. This parameter is detected by electrodes located at the bottom of the wells and is related with the surface occupation during cell growth. In some cases, 0.1 μM EC-8042 was added at the indicated times for 48 hours. After this treatment, cell cultures were washed and let to grow in fresh medium for up to one week while being monitored by the RTCA iCELLigence™ system. Data collection and analysis was performed in the RTCA Data Analysis Software 1.0 and cell proliferation was presented as normalized cell index values.



### **Western blotting**

Whole cell protein extraction and Western blot analysis were performed as previously described [10]. Primary antibodies used in these analyses were: recombinant anti-NOTCH1[EP1238Y] [(52627), 1:1000 dilution] from Abcam (Cambridge, UK); anti HES1 (E-5) [(sc-166410), 1:100] from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX); anti-MAML1 (D3K7B) [(12166), 1:1000] from Cell Signaling (Beverly, MA); and anti- $\beta$ -Actin [(A5441), 1:10,000] from Sigma Aldrich (San Luis, MI). Detection and quantification of the protein bands (IRDye fluorescent signals) was performed using the Odyssey Fc imaging system and the software Image Studio from LICOR (Lincoln, NE).

### **Transcriptome analysis**

RNA sequencing analyses of cell cultures treated with EC-8042 and MTM was performed and analyzed as previously described [11]. These RNA seq datasets are available in the GEONCBI repository (Reference: GSE161616; [https:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ geo/ query/ acc. cgi? acc= GSE16 1616](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE161616)).

### **Detection of SORE6 activity by flow cytometry**

Lentiviral reporter systems involving a SORE6 element coupled to a minimal cytomegalovirus (mCMV) driving the expression of GFP (SORE6-mCMVp-dsCopGFP-Puro) and the corresponding control lacking SORE6 (mCMVp-dsCopGFP-Puro) were previously generated and characterized [12] and kindly donated by Dr. L.M. Wakefield (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Osteosarcoma cells expressing the SORE6 (143B-SORE6-GFP and U2OS-SORE6-GFP) or their negative controls (143B-minCMV-GFP and U2OS-minCMV-GFP) were generated following previously described procedures [13]. The level of SORE6-driven GFP fluorescence in untreated cultures or after treatment with 0.1  $\mu$ M EC-8042 were analyzed by flow cytometry using a BD FACS Aria II Cell Sorter. Control 143B and U2OS-minCMV-GFP cells were used as matched SORE6 negative control for gating purposes.

### ***In vivo* tumor growth**

All animal experiments were carried out according the institutional guidelines of the University of Oviedo, and were approved by the Animal Research Ethical Committee of the University of Oviedo. Female Athymic nude mice of 6 weeks old (Envigo, Barcelona, Spain) were inoculated subcutaneously (s.c.) with 10<sup>5</sup> parental 143B, 143B-NICD, 143B-shD9 or

143B-shD10 cells. Once tumors reached approximately 100 mm<sup>3</sup>, mice inoculated with the different cell lines were randomly assigned to receive intra-venous (i.v.) treatments of saline solution (control) or EC-8042 at a dose of 18 mg/kg twice a week (n=5 per group). After receiving 6 doses, we interrupted the treatment and allowed the regrowth of the tumors of the series that received EC-8042 for an additional 4 weeks. Mice were sacrificed by cervical dislocation at the end of this protocol or when tumors reached volumes of approximately 1500 mm<sup>3</sup>. Mean tumor volume differences between groups were determined using a caliper as described [14]. Relative tumor volume (RTV) for every xenograft was calculated as follows:  $RTV = \frac{\text{tumor volume at day of measurement (Vt)} - \text{Tumor volume at the beginning of the treatment (Vo)}}{\text{tumor volume at day of measurement (Vt)}}$ . Drug efficacy was expressed as the percentage tumor growth inhibition (%TGI), calculated using the EQ:  $100 - (T/C \times 100)$ , where T is mean RTV of the treated tumor and C is the mean RTV in the control group at day of measurement.

### **Histological analysis**

Paraffin-embedded tissues from 82 patients with sarcoma who underwent resection of their tumors at the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) were used to construct a tissue microarray (TMA) as previously described [15]. 3- $\mu$ m sections of the TMA collection were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution, low pH (Dako, Glostrup, Denmark). Staining were performed at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) with an anti-NOTCH1 antibody (#3608) from Cell Signaling (Danvers, MA) at 1:300 dilution using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer, Denmark). Counterstaining with hematoxylin was the final step. Immunostaining was scored blinded to clinical data by two independent observers, using a semiquantitative scoring system based on both the percentage of stained cells (1: 0%; 2: <10%; 3: 10-50%; and 4: >50%) and the staining intensity (0: no expression; 1: low intensity; and 2: high intensity). Each sample received a scoring value resulting from the multiplication of both scores, and the median value in the resulting distribution was used to discriminate low and high expressing samples. Tumor grade was analyzed in H&E stained samples using the French Federation of Comprehensive Cancer Centers (FNCLCC) grading system.

## Statistical Analyses

For the *in vitro* experiments and the tumor growth experiment *in vivo*, the statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0. All data are represented as mean ( $\pm$ SD or SEM as indicated) of at least three independent experiments unless otherwise stated. Student's t test was performed to determine the statistical significance between groups. For immunohistochemical analysis, the experimental results distributed among the different clinical groups of tumors were tested for significance employing the  $\chi^2$  test (with Yates' correction, when appropriate). Survival curves were calculated using the Kaplan-Meier product limit estimate. Differences between survival times were analyzed by the log-rank method and the Hazard Ratio was calculated by univariate Cox regression analysis. All statistical analysis was carried out with the software package SPSS 24 (SPSS, IBM corp). All tests were two-sided and  $p < 0.05$  values were considered statistically significant.

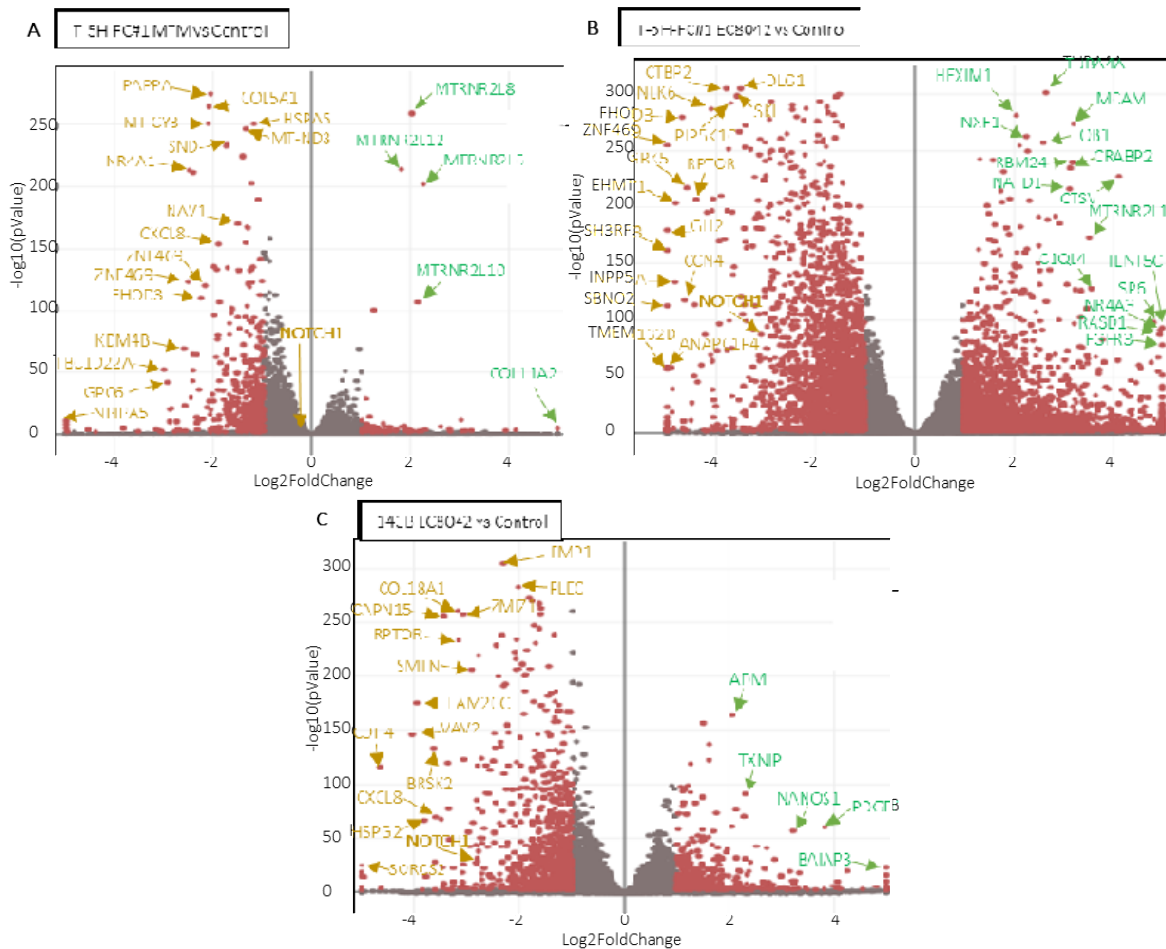
## RESULTS

### **EC-8042 inhibits several tumor related signalling pathways at transcriptional level more efficiently than mithramycin**

In order to reveal molecular mechanisms involved in the anti-tumor effect of EC-8042 and MTM against sarcomas we performed RNAseq analyses in the myxoid liposarcoma model T-5H-FC#1 treated for 24h with its  $IC_{50}$  values for MTM (25 nM) or EC-8042 (300 nM), and in the osteosarcoma cell line 143B treated with its  $IC_{50}$  for EC-8042 (100 nM). First, we differentially expressed genes (DEG) (fold change  $\leq -2$  or  $\geq 2$  and  $padj < 0.01$ ) in T-5H-FC#1 cells treated with MTM or EC-8042 in comparison with the untreated control (**Figure 1A-B**). We found that EC-8042 produces a more profound gene expression modulation than MTM (4757 DEGS by EC-8042 vs 480 by MTM). As expected by their activity as transcription factor repressors, both compounds showed a strong ability to repress gene expression (2432 downregulated DEGS by EC-8042 vs 400 by MTM); however, EC8042 was also able to induce the upregulation of high proportion of genes (2325 upregulated targets by EC-8042 vs. 80 by MTM).

This pattern of gene modulation produced by EC-8042, with a higher proportion of downregulated (886) vs upregulated (482) targets, was also observed in 143B osteosarcoma cells (**Figure 1C**). In any case, there was a high degree of overlapping between genes

commonly regulated by EC-8042 in T-5H-FC#1 and 143B cells (65.69% of downregulated and 54.77% of overexpressed DEGS in 143B cells were also modulated in T-5H-FC#1 cells). Among relevant factors commonly downregulated by EC-8042 in both cell lines we found SP1 target genes such as VEGFA ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -2.4$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.31$ ), PDGFA ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -2.13$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -0.55$ ), ABCC1 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -3.11$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.5$ ), RPTOR ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -4.4$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -3.15$ ) or TERT ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -2.14$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -2.36$ ). Other commonly affected targets include cytokines as CXCL3 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -1.81$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.59$ .) or CCL2 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -5.99$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.19$ ), tyrosine kinases as SRC ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -1.04$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -0.97$ ), FAK/PTK2 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -2.12$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.23$ ) or AKT1-3 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -1.05, -1.66, -1.30$  respectively;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.41, -0.59, -0.57$  respectively); or closely cancer associated ligands as WNT5 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -1.78$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -0.64$ ), WNT5B ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -3.95$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -2.22$ ) or CDH4 ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -2.74$ ;  $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -4.66$ ).



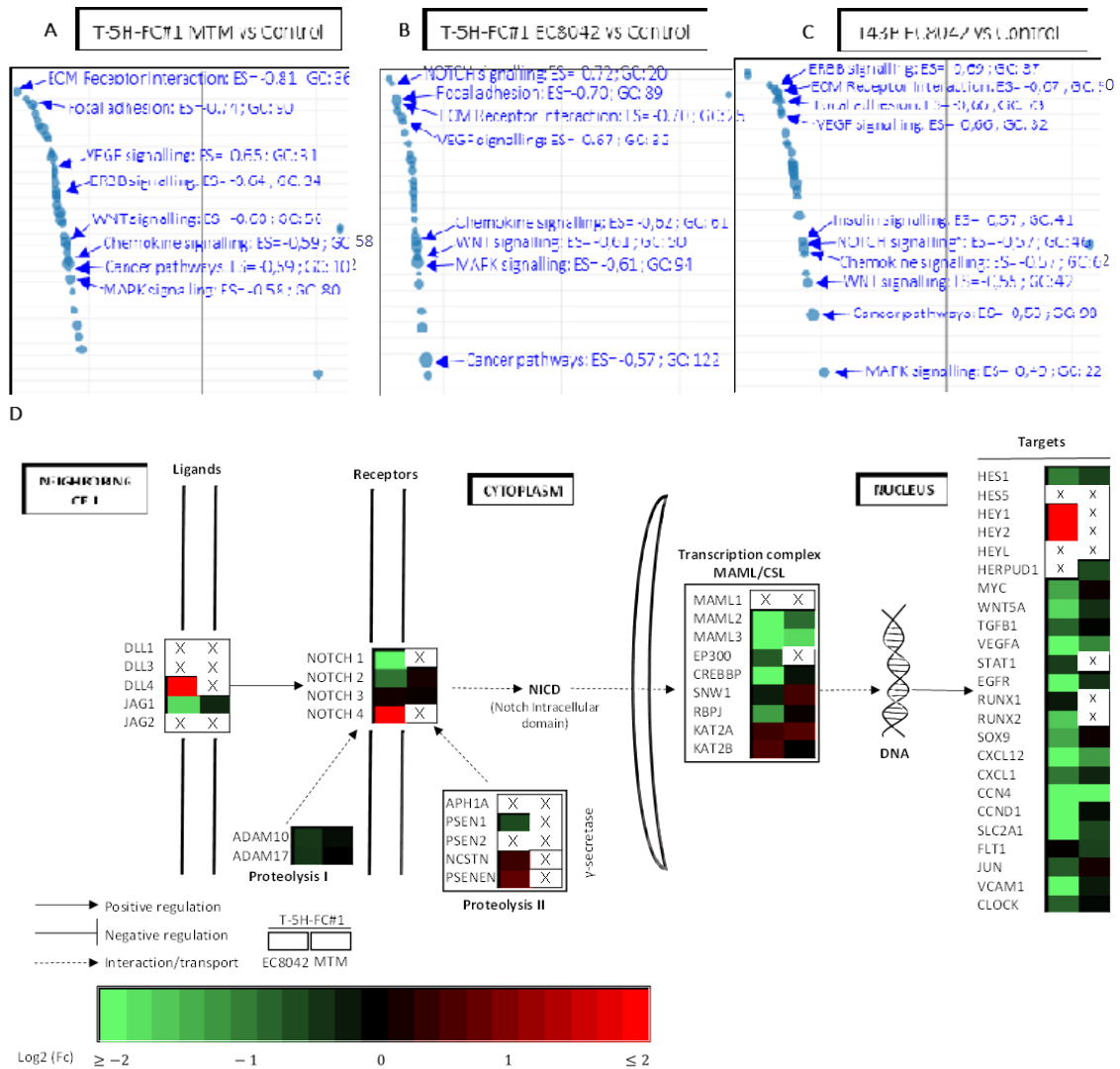
**Figure 1.** Transcriptome analysis of sarcoma cells treated with MTM and EC-8042. RNAseq analysis of T-5H-FC#1 and 143B cells treated in triplicate with either DMSO (carrier control), or their respective IC50 for EC-8042 (300 nM for T-5H-FC#1 and 100 nM for 143B) for 24h. This analysis also includes triplicate samples of T-5H-FC#1 cells treated with the IC50 for MTM (25 nM) for 24h. (A-D) Volcano plots showing those genes significantly up-regulated and downregulated (fold change  $\leq -2$  or  $\geq 2$  and  $\text{padj} < 0.01$ ; red dots) when comparing MTM-treated vs control T-5H-FC#1 cells (A), EC-8042-treated vs control T-5H-FC#1 cells (B), and EC-8042-treated vs control 143B cells (C). Selected relevant genes displaying highly significant p values and/or higher fold change modulation are indicated.

### **EC-8042 act as a multi-target repressor of NOTCH signaling in sarcoma cells.**

KEGG pathway analysis of DEGs also show a predominant inhibitory effect of both MTM and EC-8042 in sarcoma cells (**Figure 2A-C**). Thus, most of the pathways significantly altered ( $\text{padj} < 0.01$  and  $\text{ES} < -0.5$  or  $> 0.5$ ) in T-5H-FC#1 cells by EC-8042 (33 out of 34) and MTM (43 out of 46) or in 143B cells by EC-8042 (30 out of 31) displayed significant negative enrichment scores ( $\text{ES} < -0.5$  and  $\text{padj} < 0.01$ ) and were therefore predicted to be repressed after these treatments. In addition, many of these altered pathways were mutually modulated by both treatments (54.55% of pathways commonly altered in T-5H-FC#1 cells). Both drugs affected key oncogenic pathways such as those controlled by VEGF, WNT, ERBB, Focal adhesion targets, or ECM receptor interaction factors. In addition, it is important to mention the differential action of EC-8042 and MTM on other relevant pathways. This is case of NOTCH signaling which is strongly inhibited by EC-8042 ( $\text{ES} = -0.72$  and 20 DEGs related with the pathway in T-5H-FC#1 cells and  $\text{ES} = -0.57$  and 47 DEGS in 143B cells) but not significantly altered by MTM. As an example of this differential modulation, the expression of NOTCH1, a key receptor of the pathway, is efficiently inhibited by EC-8042, both in T-5F-FC#1 cells ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -3.25$ ) and 143B ( $\text{Log}_2\text{FC}_{143\text{B}} = -1.59$ ), but is not affected by the treatment with MTM ( $\text{Log}_2\text{FC}_{\text{T-5H-FC\#1}} = -0.16$ , non-significant) (**Figure 1A-D**). A more comprehensive analysis of the RNAseq data along the NOTCH signaling pathway evidenced the differential modulation by EC-8042 and MTM in T-5H-FC#1 cells at different steps of the pathway (**Figure 2D**). With the exception of the ligand DLL4, the receptor NOTCH4 or a few transcriptional targets (such as HEY1 or HEY2), which were upregulated, the expression of most of the components of the pathway were inhibited by EC-8042. This included relevant factors of the route such as the ligand JAG1, the receptors NOTCH1 and 2, different components of the transcriptional complex such as RBPJ, MANL factors, CREBBP or EP300 and most of the well-known downstream

targets of the pathway, like HES1, C-MYC, SOX9 or CCND1. A similar inhibitory effect of EC-8042 on NOTCH signaling was also observed in 143B osteosarcoma cells (**Figure S1**). In this case, although none of the ligands were downregulated, the NOTCH1 receptor and most of transcriptional complex components and downstream targets were inhibited by the mithramycin analog.

In summary, these analyses reveal that both MTM and EC-8042 act as potent repressor of relevant cancer-related pathways in sarcomas cells. However, EC-8042 shows an exclusive ability to inhibit NOTCH signaling at multiple levels.

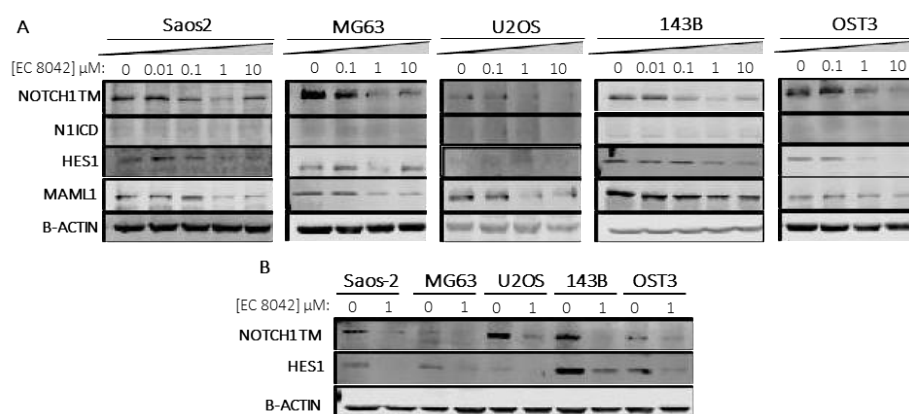


**Figure 2.** Signaling pathways altered after the treatment of sarcoma cell lines with MTM or EC-8042. RNAseq data were used to perform gene ontology analyses. (A-C) KEGG pathway analysis showing signaling routes significantly altered (enrichment score (ES)  $\leq -0.5$  or  $\geq 0.5$  and  $p_{adj} < 0.01$ ; blue circles) when comparing MTM-treated vs control T-5H-FC#1 cells (A), EC-8042-treated vs control T-5H-FC#1

cells (B) and EC-8042-treated vs control 143B cells (C). Circle diameter for each pathway reflect the number of genes involved in the pathway (gene count, GC) showing altered expression. Information for relevant CSCs-related pathways (blue text) is displayed. (D) NOTCH1 signaling pathway scheme showing upregulation or downregulation levels of relevant components of the pathway in T-5H-FC#1 cells treated with EC-8042 or MTM in comparison with control cells. Green and red colors indicate significant downregulation and upregulation, respectively. Targets with non-significant p-values are labeled with an X.

### Inhibition of NOTCH1 signaling by EC-8042 in osteosarcoma cell lines.

To confirm the results of our transcriptomic analysis regarding the ability of EC-8042 to inhibit NOTCH1 signaling in sarcoma cells, we performed Western Blotting analyses to check the effect of the treatment with increasing concentrations of drug for 24 hours on the expression of several NOTCH signaling components in a panel of four established osteosarcoma cell lines (143B, Saos2, U2OS and MG63) and a low-passaged patient-derived osteosarcoma line (OST3) (**Figure 3A**). We analyzed the expression of the two cleaved forms that originate during the process of activation of NOTCH1 upon ligand binding, a  $\approx 110$  KDa transmembrane (TM) form resulting from a first cleavage by ADAM proteases in the extracellular region and the  $\approx 80$ -90 KDa NICD that is released in the cytosol after a second cleavage by  $\gamma$ -secretases. We detected a higher abundance of the TM form in all lines. In any case, EC-8042 produced a dose-dependent downregulation of both forms in all cell lines. We also, analyzed the expression of the transcriptional complex component MAML1 and the downstream target HES1. Similar to NOTCH1, these proteins also follow



**Figure 3.** Inhibition of NOTCH1 signaling in osteosarcoma cell lines. (A) Western blotting analyses of relevant components of the NOTCH1 pathway in a panel of osteosarcoma cell lines treatment with increasing concentrations of EC-8042 for 24h. (B) Similar analysis of the expression of NOTCH1-related factors in samples of the different osteosarcoma cell lines treated or not with 1  $\mu$ m EC-8042 for 24 hours and loaded in the same blot. The expression of  $\beta$ -actin was used as loading control.

a dose-dependent downregulation pattern (**Figure 3A**). Similar results were also observed in an experiment where samples of all cell lines, treated or not with 1  $\mu$ M EC-8042 for 24 hours, were analyzed in the same blot (**Figure 3A**). In this experiment, we found that these factors were expressed at different levels in all cell lines and confirmed the ability of EC-8042 to inhibit the expression of NOTCH1 and HES1.

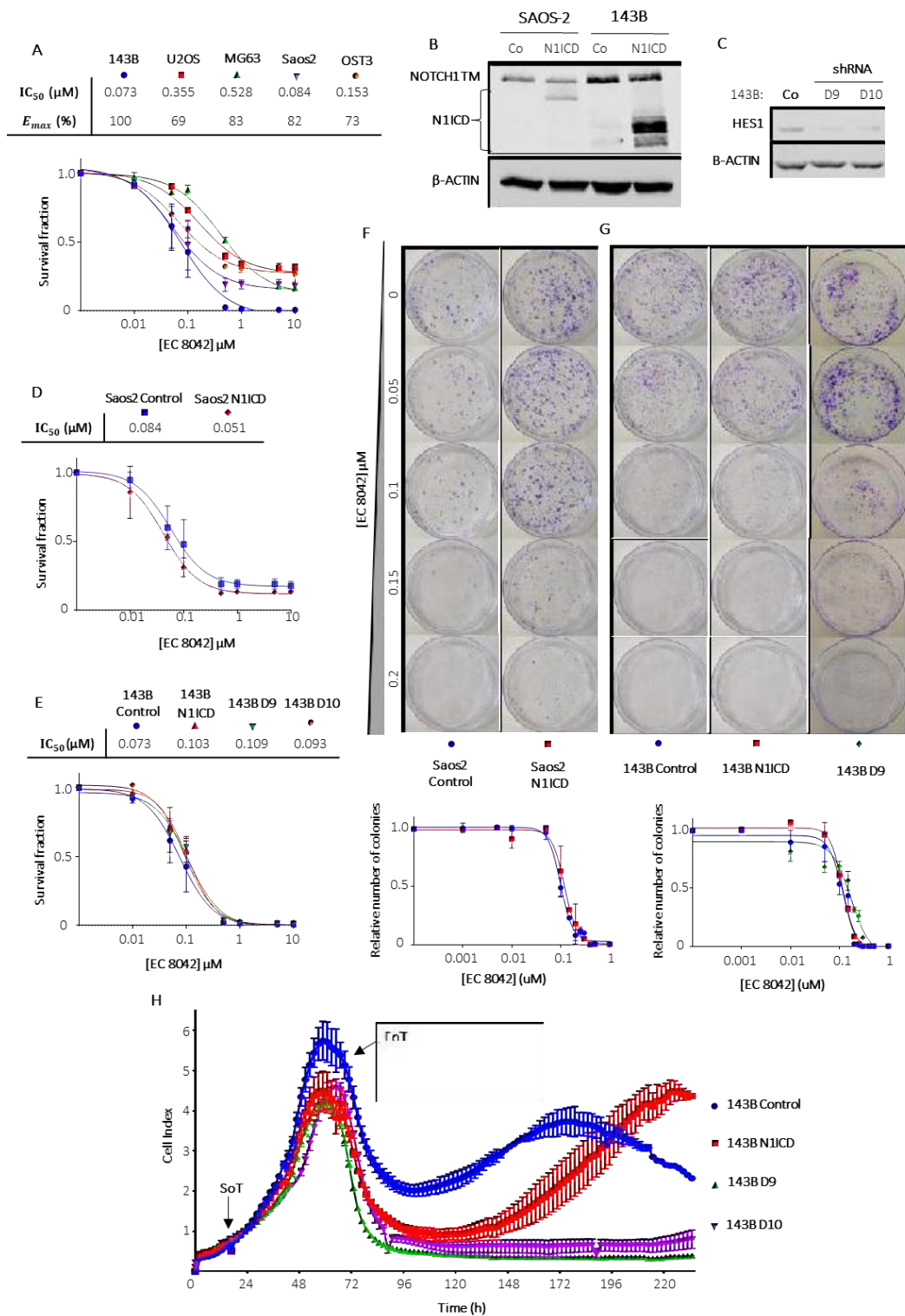
### **Modulation of NOTCH1 or Hes1 expression influences the recovery of osteosarcoma cells after the treatment with EC-8042**

To analyze the antiproliferative effect of EC-8042 we performed cell viability assays in osteosarcoma cell lines treated for 48 hours with increasing doses of the drug. We found that the 143B cell line was the most sensitive to effect of EC-8042 with an  $IC_{50}$  of 0.073  $\mu$ M and a maximum effect ( $E_{max}$ , percentage of growth inhibition reached with higher concentration assayed) of 100%, being the rest of the cell lines still sensitive although with higher  $IC_{50}$  (ranging from 0.084 to 0.53  $\mu$ M) and lower  $E_{max}$  percentages (ranging from 69 to 84%) (**Figure 4A**).

To study whether the ability of EC-8042 to inhibit NOTCH1 signalling plays any role in the antiproliferative activity of this drug we overexpressed active NOTCH1 in 143B (143B-NICD) and Saos2 (Saos2-NICD) cells (**Figure 4B**) using lentiviral particles for the expression of NICD cDNA. Parallel, we silenced HES1 expression in 143B cells using two different shRNAs (143B-shD9 and 143B-shD10) (**Figure 4C**).

When treated with EC-8042 for 72 hours in cell viability assays, we did not find significant changes in the sensitivity to this drug between NICD-overexpressing or HES1-depleted osteosarcoma cells and their respective control lines (**Figure 4D-E**). Similarly, we found that EC-8042 displayed a similar antiproliferative effect in all models in colony-forming assays (**Figure 4F-G**).





**Figure 4.** Antiproliferative effect of E-8042 in osteosarcoma cell lines. (A) Cell viability (WST1 assay) measured after the treatment of a panel of osteosarcoma cell lines with increasing concentrations of EC-8042 for 48h. The  $IC_{50}$  and maximum effect ( $E_{max}$ ) values are shown. (B) Protein expression levels of NOTCH1 (TM and NICD forms) in control (Co) and NICD-overexpressing (NICD) Saos2 and 143B cells. (C) Protein expression levels of HES1 in control (Co) and HES1-silenced (D9 and D10) 143B cells.  $\beta$ -actin

was used as loading control for western blotting analysis. (D-E) Cell viability assay of NOTCH1-signaling modified Saos2 (D) and 143B cells (E) treated with increasing concentrations of EC-8042 for 48h. IC<sub>50</sub> values are shown. (F-G) Colony formation unit (CFU) assays for control and NOTCH1-signaling modified Saos2 (F) and 143B cells (G) treated with increasing concentrations of EC-8042 for 24h before letting them to form CFUs for 10 days. Representative images of CFU assays for each condition (top panels) and summary graphics (bottom panels) are shown. (H) Real time proliferation (cell index) measured using a iCellingence™ system of parental and NOTCH1-signaling modified 143B cells treated with EC-8042 0.25 μM for 48h and left to recover in fresh medium for one week. SoT and EoT indicated the start and the end of treatment respectively. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.

To further explore whether NOTCH1 signaling modulation produce any impact in the response of osteosarcoma cells to EC-8042, we analyzed the ability of parental, N1ICD-overexpressing and HES1-depleted 143B cells to recover after a treatment with 0.25 μM for 48 hours (**Figure 4H**). Using the iCellingence™ system to follow the real time proliferation of the different cultures we found parental 143B proliferated slightly faster during the treatment and showed a slightly poorer response to EC-8042 than the rest of models. When we analyzed how the different models recovered cell growth once the drug was removed, we noticed that although the control 143B cells recover earlier than the rest of models, most likely due to its poorer response, 143-NICD cells showed a more robust recovery and was able to reach a higher level of confluence than that reached by control cells. More strikingly, both cell lines with silenced expression of HES1 did not show any recover of cell growth after the remove of EC-8042 (**Figure 4H**).

### **NOTCH1 signaling inhibition plays a key role in the anti-CSC activity of EC-8042**

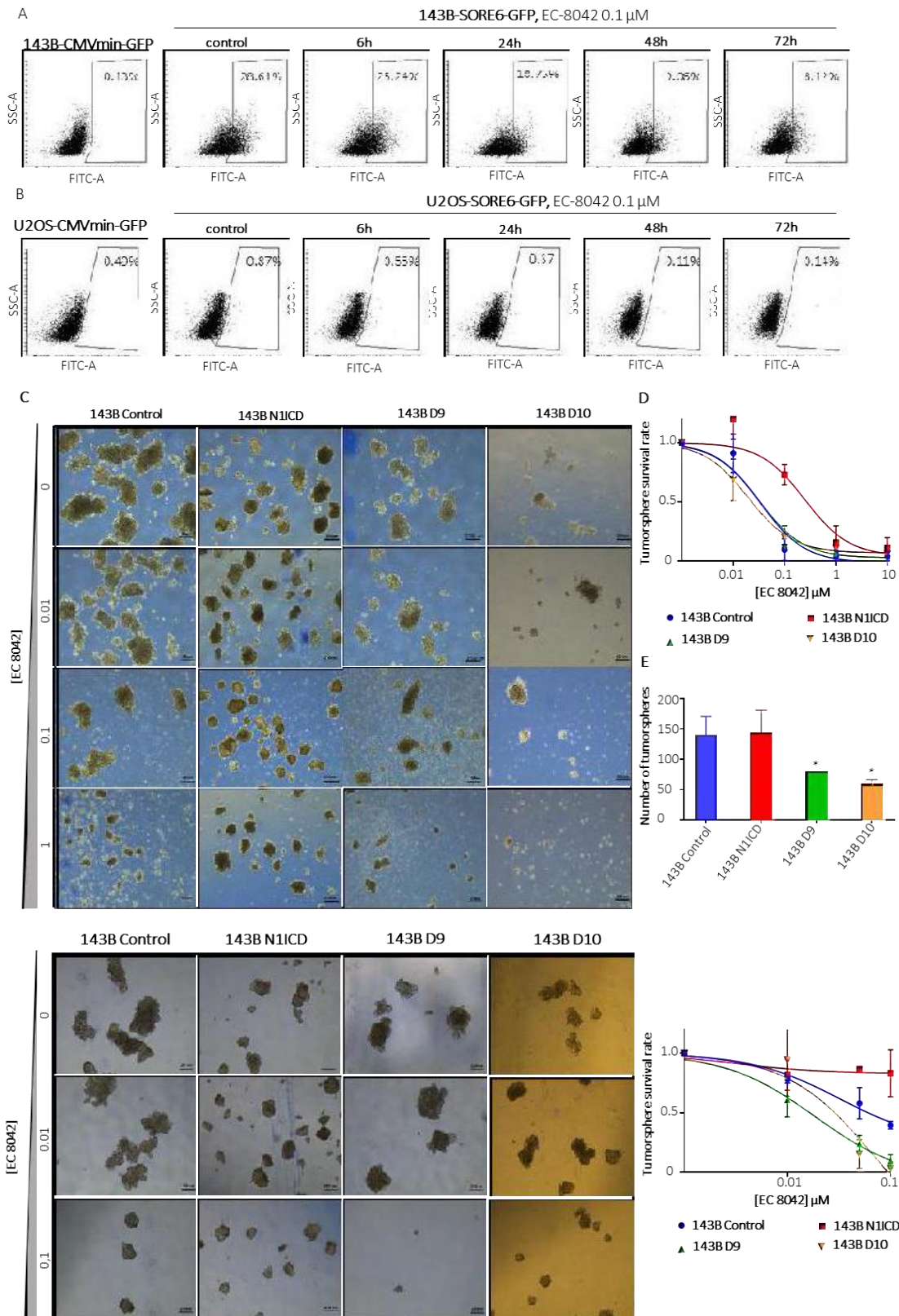
The differential ability to recover after the treatment with EC-8042 could be related with the distinct ability of the drug to target CSCs in sarcomas cells with enhanced or impaired NOTCH1 signaling. Therefore, we aimed to study the role of NOTCH1 signaling inhibition in the anti-stemness activity of EC-8042. First, we check the effect of EC-8042 on CSCs subpopulations of osteosarcoma cell lines. Thus, we treated with EC-8042 variants of 143B and U2OS cell lines that express a lentiviral reporter system, in which GFP expression is controlled by a composite SOX2/OCT4 response element (SORE6) (143B-SORE6-GFP and USOS-SORE6-GFP cell lines). This reporter allows the dynamic monitoring of CSCs subpopulations with increased transcriptional activity of the pluripotency factors SOX2 and OCT4 [578-580]. Using cell lines that express a control construction without SORE6 (143B-

minCMV-GFP and USOS-minCMV-GFP) as gating control we were able to establish the basal level of SORE6 positive subpopulations in each cell line and to monitor the effect over time of the treatment with 0.1  $\mu$ M EC-8042 (**Figure 5A-B**). 143B-SORE6-GFP cells showed a high basal level of SORE6 positive cells of 28.61%, whereas the U2OS-SORE6-GFP cell line displayed a much more reduced level of 0.87%. In any case, both cell lines experienced a gradual and consistent reduction of SORE6 positive cells after the treatment with EC-8042, that reached a 70-80% decrease after 72 hours of treatment (**Figure 5A-B**). These results confirmed the ability of EC-8042 to target CSCs in osteosarcoma.

To determine the role of NOTCH1 signaling in the response of sarcoma CSCs to EC-8042, we grew cultures of CSC-enriched 3D tumorspheres [569, 581] from parental 143B, 143B-NICD, 143B-shD9 y 143B-shD10 cells and treated them with increasing concentrations of EC-8042. As observed in the experiments using the SORE6 reporter, we confirmed that tumorspheres formed by parental 143B cells were highly sensitive to the anti-stemness activity of EC-8042 ( $IC_{50}$ = 0.034  $\mu$ M). Importantly, we also found that 143B-NICD-formed tumorspheres ( $IC_{50}$ = 0.248  $\mu$ M) were approximately 7.5 times less sensitive than parental cells (**Figure 5C-D**). In addition, although in untreated conditions HES1-silenced cells formed significantly less tumorspheres than parental 143B or 143B-NICD (**Figure 5A**), 143B-shD9 and 143B-shD10 tumorspheres seemed to respond similar than parental cells to the treatment with EC-8042 (**Figure 5C-D**).

To further explore how the modulation of NOTCH1 signaling affect the anti-stemness potential of EC-8042, we treated adherent cultures from all 143B models with increasing concentrations of EC-8042 for 48 hours and then grown them under CSC culture conditions to assay the formation of tumorspheres. Again, we found that EC-8042 was able to efficiently eliminate CSCs with tumor-forming potential in parental 143B cells, thus resulting in reduced tumorsphere formation (**Figure 5E-F**). Also, in concordance with the results obtained after the direct treatment of tumorspheres, we observed 143B-NICD cells were more much resistant than parental cells to the anti-CSCs effect of EC-8042. Finally, in this case we found that the mithramycin analog was more effective in eliminating CSCs when HES1 was silenced, as seen by comparing tumorsphere formation in 143B-shD9 or 143B-D10 with that of parental cells (**Figure 5E-F**).

In sum, this gain and loss of function experiments strongly suggest that the inhibition of NOTCH1 pathway plays a key role in the anti-stemness activity of EC-8042.

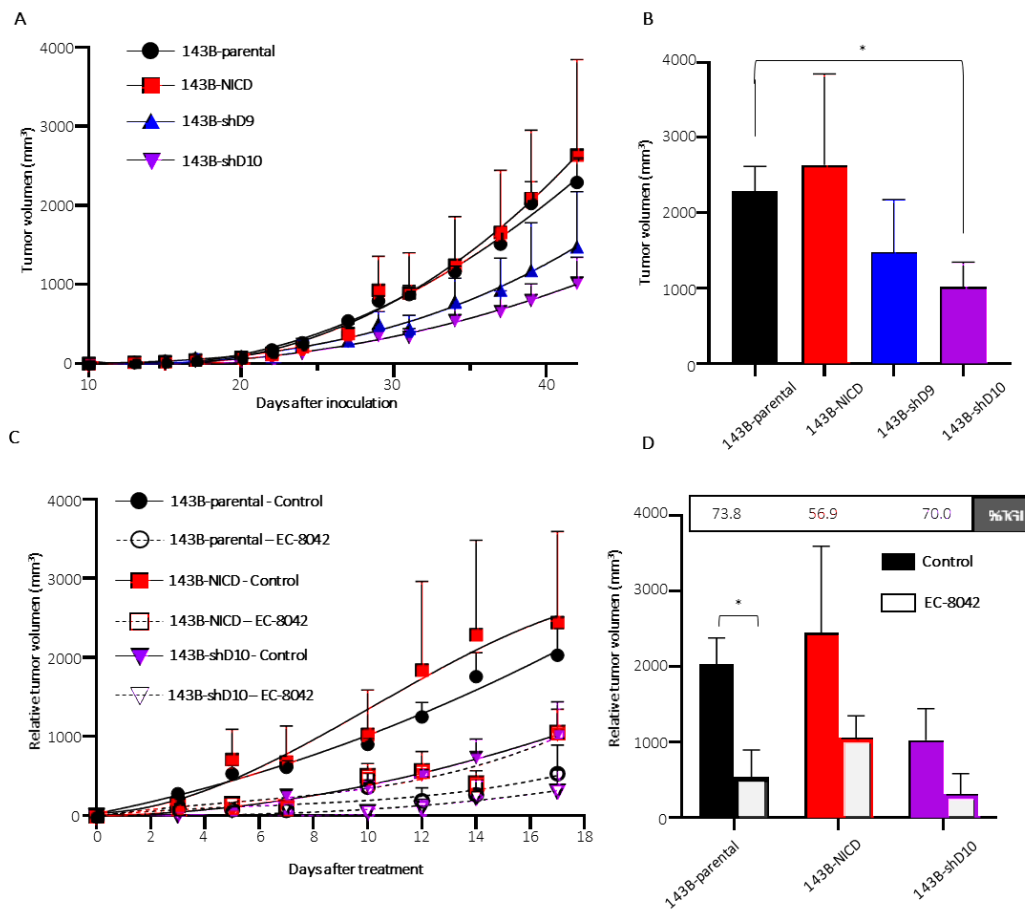


**Figure 5.** Effect of EC-842 on osteosarcoma CSCs subpopulations. (A-B) Flow cytometry analysis of SORE6+ subpopulations (cells presenting transcriptional activity of the pluripotency factors SOX2 and OCT4) in 143B-SORE6-GFP (A) and U2OS-SORE6-GFP (B) cells after the treatment with 0.1  $\mu$ M EC-

8042 for the indicated times. The cell lines 143B-CMVmin-GFP and U2OS-CMVmin-GFP were used as gating controls. (C-E) CSC-enriched tumourspheres of parental and NOTCH1-signaling modified 143B cells were treated with increased concentrations of the indicated MTM formulations for 72 h. Representative images of the spheres cultures (C), the quantification of the cell viability (WST-1 assay) of spheres (represented as % of control) at the end of the treatment (D) and the counting of number of spheres formed in untreated conditions (E) are shown. (F-G) parental and NOTCH1-signaling modified 143B cells were treated with the indicated concentrations of EC-8042 for 48h were grown in tumorsphere culture conditions for 10 days. Representative images (F) and quantification of cell viability (represented as % of control) of the spheres (G) at the end of the experiment are shown. Scale bars = 250  $\mu$ m. Error bars represents standard deviation measured from at least three independent replicates and asterisk indicate a statistically significant difference with the control group (\*:p<0.05; two-sided Student t test).

### **Modulation of NOTCH1 signalling in osteosarcoma cells influences the response to EC-8042 *in vivo***

Next, we aimed to study whether the modulation of NOTCH signalling also affected tumor growth and the response to EC-8042 *in vivo*. First, we monitored tumor growth in immunodeficient mice inoculated with parental 143B, 143-NICD, 143B-shD9 or 143B-shD10 cells (**Figure 6A**). We found that both cell lines with silenced expression of HES1 grew tumors at a slower rate comparing to parental or NICD-overexpressing cells (**Figure 6A-B**). Then, we treated immunodeficient mice carrying xenografts generated by parental 143B, 143B-NICD or 143B-shD10 cells with saline or 18 mg/Kg EC-8042 twice a week (**Figure 6C**). This experiment evidenced that 143B-NICD-overexpressing showed a poorer response to EC-8042 than parental cells. After six doses of treatment with EC-8042, we observed a significantly higher reduction of tumor growth in parental cells (%TGI= 73.8) than in 143B-NICD (%TGI= 56.9%) (**Figure 6D**). As shown above, 143B-shD10 cells showed a reduced ability to grow tumors compared to parental cells. The anti-tumor effect of EC-8042 in tumors generated by HES1-silenced cells (%TGI= 70.0%) was similar to that observed in parental cells. However, the cumulative effect of HES1 depletion and EC-8042 treatment resulted in a lower overall tumor growth rate in 143B-shD10 cells (**Figure 6C-D**). Altogether, these data show that the overexpression of NICD reduced anti-tumor activity of EC-8042, most likely by hamper its ability to target CSCs. On the other hand, silencing of HES1 may cooperate with EC-8042 and render sarcoma CSCs more sensitive to this drug.



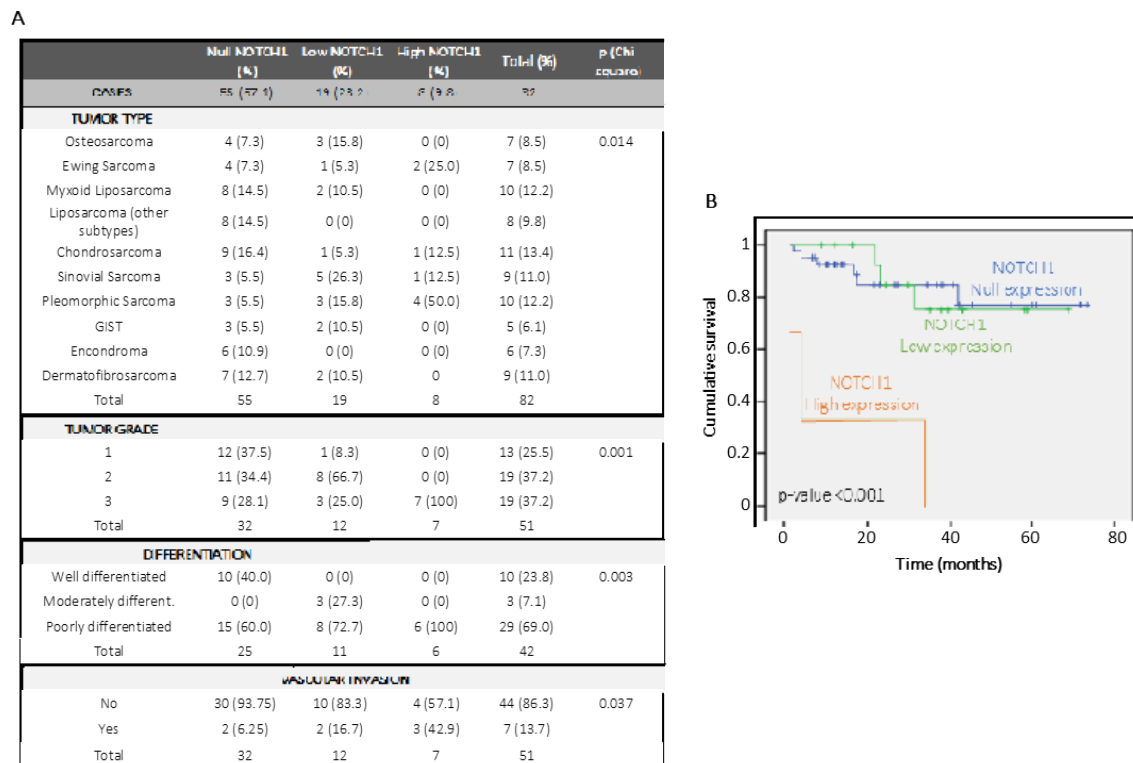
**Figure 6.** Modulation of NOTCH1 signaling in osteosarcoma cells influences tumor growth and the response to EC-8042 *in vivo*. A) Curves representing the mean volume of xenograft tumors generated by 143B-parental, 143B-NICD, 143B-shD9 and 143B-shD10 cells. B) Mean tumor volumes at the end of the experiment (day 42 after the inoculation). C-D) Xenografts generated with 143B-parental, 143B-NICD and 143B-shD10 cells were randomly assigned to control groups (treated with saline) (n=5 per group) or groups treated with EC-8042 at 18 mg/Kg twice a week (6 doses) (n=5 per group). (C) Curves representing the mean relative tumor volume of xenografts during the treatments. (D) Relative tumor volumes at the experimental end point (day 17 after the start of the treatment) . Drug efficacy expressed as the percentage of TGI is indicated. Error bars represent the SEM and asterisks indicate statistically significant differences between groups in two-sided Student t-tests (\*:p<0.05).

### NOTCH expression is related with poor prognosis in clinic

Finally, we aimed to investigate whether the expression of NOTCH1 in sarcoma patients is clinically relevant. Thus, the nuclear expression of this receptor was analyzed by immunohistochemistry in a collection of tissue microarrays, including 82 samples from 10 types of sarcomas. Patient specimens were categorized as samples with null, low or high

NOTCH1 expression according to percentage of stained cells and the staining intensity. Low and high NOTCH1 nuclear expression was detected in 19 (23.2%) and 8 (9.8%) sarcoma samples respectively (**Figure 7A**). Importantly, NOTCH1 expression correlated with higher tumor grade ( $p = 0.001$ ), poor differentiation ( $p = 0.003$ ) and vascular invasion ( $p = 0.037$ ) (**Figure 7A**). Moreover, null and low NOTCH1 expression cases showed a longer survival time when compared to those showing a high expression of this factor (61 months (95%CI 52-70) for null cases; 58 months (95%CI 48-69) for low cases; and 13 months (95%CI 0-34) for high expression cases ( $p < 0.001$ , KM analysis); the HR for high expressing cases compared to null cases was 11.095 (95%IC 2.7-45.6) ( $p < 0.001$ ) (univariate Cox analysis). The 5-year survival rate was 77% for null cases, 75% for low expression cases and 0% for high expression cases (**Figure 7B**).

In summary, we found that nuclear expression of NOTCH1 correlates with more aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in sarcoma patients. These findings reinforce the relation between NOTCH1 expression and the development of a CSC phenotype, which is commonly associated with a worse course of the disease, and support the relevance of treating sarcomas with therapies capable of inhibiting NOTCH1 signalling.



**Figure 7.** Immunohistochemical analysis of NOTCH1 nuclear expression in sarcoma patients and associations with clinical data. (A) Distribution of sarcoma cases (N=82) according to their NOTCH1 expression levels across categories of the indicated patient characteristics and tumor clinicopathologic

parameters. p values for each classification are shown. (B) Kaplan-Meier cumulative survival curves categorized by NOTCH1 protein expression in the cohort of sarcoma patients. Cases were classified using scores calculated by multiplying nuclear NOTCH1 expression percentages scores (0=0%; 1=1-10%; 2=11-50%; 3=>50%) with nuclear Notch-1 expression intensity scores (0=nule; 1=weak; 2=high). Obtained score range were between 0-2. p-value were estimated using the log-rank test.

## DISCUSSION

Over the last decades, the lack of advances in the treatment of osteosarcomas, together with the poor prognosis associated with high grade cases, have led to increased efforts in the search of new therapeutic options against these tumors. In this context, several studies have highlighted the close relation between the usual aggressive evolution of osteosarcomas and the presence of subpopulations displaying CSCs phenotypes, thus stressing the need for therapies able to neutralize these subpopulations [1-5]. In this regard, MTM has been revealed as a potent antitumor agent with anti-CSCs activity [6-10]. Due to the adverse toxic effects of MTM on healthy tissues, several MTM analogs, showing similar anti-tumor activity but a much safer toxicity profile, has been developed in recent years [11]. Among them, EC-8042 has emerged as the MTM analog leading candidate by its powerful anti-tumor activity in wide variety of tumors, including sarcomas [12-18], and its potential to target CSCs. Thus, EC-8042 was able to repress the expression of CSC-associated markers and eliminate CSCs in head and neck tumors [19] and prostate cancer [20]. Moreover, this compound was able to overcome acquired drug resistance in triple negative breast cancer [15] and ovarian neoplasms [21]. In sarcomas, we have previously shown that EC-8042 demonstrated greater potential to inhibit the tumor growth of soft tissue sarcomas models than doxorubicin. Notably, this antitumor activity was linked to its ability to inhibit the expression and activity of genes associated to the CSC phenotype and with its strong potential to eliminate CSCs *in vitro* and *in vivo* [4, 22]. In this work, we expand the panel of tumor types in which EC8042 shows anti-CSC activity to include osteosarcomas.

To gain insights about the molecular mechanisms involved in the anti-tumor activity of MTM, we have previously analyzed the changes induced by the IC50 concentration of this drug in the transcriptome of the liposarcoma model T-5H-FC#1 [6]. Here, we provide a similar analysis of the effects of the IC50 values of EC-8042 in the same liposarcoma model and an osteosarcoma cell line (143B). Both MTM and EC-8042 induced a robust pattern of transcriptional repression, which is in line with the ability of these compounds to interact with GC-rich sequences of DNA, thus preventing the binding of relevant transcription



factors to their promoters. Compared to MTM, EC-8042 showed a greater inhibitory potential against cancer associated genes, being able to target more efficiently targets such as VEGFA, PDGFA, TERT, ABCC1, RPTOR or NOTCH1; many of them modulated by SP1, the mostly described MTM and EC-8042 target [17, 23-25]. Interestingly, EC-8042 also shows a higher amount of over activated targets than MTM. Our transcriptomic analysis also showed a high degree of overlap between the genes modulated by EC-8042 in liposarcoma and osteosarcoma models, thus suggesting common mechanisms of action in different sarcoma types. Among the signaling commonly altered by MTM and EC-8042 in both tumor models, it is worth mentioning the strong ability of this drugs to inhibit the expression of CDH4, which encodes R-cadherin and has been found as a critical determinant of osteosarcoma tumorigenesis and metastasis [26]. Previous studies have reported the ability of EC-8042 to inhibit specific pro-tumor targets in different tumor types. Thus, EC-8042 was able to repress the expression of SRC and FAK in head and neck cancer cells [27], VEGFA, TERT and SRC in ovarian cancer [16] and WNT5, THBS1, CXCL8, MMP1 and SCG2 in melanoma [14]. Our transcriptome analyses also showed that EC-8042 induced an efficient repression of these factors both in liposarcoma and osteosarcoma cells. On the other hand, other factors reported to be inhibited by the MTM analog in other tumor types, such as BRCA2 in ovarian cancer [17] or SETDB2 in melanoma [14], were little or non-affected in sarcomas models. These data suggest that, in addition to the targets commonly affected by EC-8042 regardless of tumor type, there are also factors that are exclusively inhibited in certain types of cancer and could correspond to tumor-specific EC-8042 mechanisms of action.

Ontological analysis of the signaling altered by MTM and EC-8042 also showed a preferential inhibitory profile of many relevant pro-tumor pathways. Many of them are common for both drugs, but other pathways were specifically modulated by EC-8042 both in liposarcoma and osteosarcoma models. Among the signaling specifically altered by EC-8042, NOTCH1 signaling is known to play oncogenic and pro-stemness roles in many types of tumors [28]. In osteosarcomas this signaling seems to play particularly relevant pro-tumorigenic roles. Thus, an aberrant activation of NOTCH signaling could play a role as tumor driver event [29]. In addition, it has been reported that primary osteosarcomas showed increased levels of NOTCH receptors, ligands and downstream target genes, which seems to play a role in the acquisition of drug-resistant phenotypes and in the progression and

dissemination of the disease [30-34]. Importantly, the expression of HES1 was inversely correlated with the survival of osteosarcoma patients [35].

Moreover, the survival rate of those patients with high serum levels of NOTCH1 and HES1 was significantly lower than that of the group presenting low levels [36]. In line with these results, our own analysis of NOTCH1 expression in a collection of 82 samples from ten different types of sarcomas, confirmed that the expression of this receptor correlated with more aggressive phenotypes and poorer disease outcome.

The ability of EC-8042 to Inhibit NOTCH1 signaling is also relevant in view of the limitations of the drugs used so far to inhibit of this pathway in cancer. Main strategies to inhibit this signaling involve the use of  $\gamma$ -secretase inhibitors or antibodies against NOTCH receptors [37, 38] . Although these approaches have been considered for clinical use against different neoplasms, serious side effects observed during clinical trials evidence the narrow therapeutic window of this drugs [37, 39]. Therefore, EC-8042 could represent a safer alternative to currently available NOTCH signaling inhibitors. Opposite to other inhibitory strategies, EC-8042 is able to inhibit NOTCH1 signaling at different levels including the NOTCH1 receptor, most of the components of the transcriptional complex of NOTCH and many of the transcriptional targets of the pathways. However, a few of the well-known NOTCH-regulated targets effectors, such as HEY1 or HEY2, as well as some NOTCH ligands, specially DDL4, and receptors, like NOTCH4, were found upregulated by EC-8042 treatment in our RNA seq analysis. This could be explained by alternative activation mechanisms mediated by non-canonical NOTCH signaling routes in response to the strong inhibition of the canonical pathways induced by EC-8042 [40, 41].

NOTCH signaling have also been involved in mediating stemness phenotypes in osteosarcoma [30, 42, 43]. Therefore, we explored the hypothesis that the anti-CSC activity of EC-8042 could be mediated by its ability to inhibit NOTCH signaling. First, we found that osteosarcoma cells depleted for HES1 formed significantly less CSC-enriched tumorspheres *in vitro* and smaller tumors *in vivo* than parental cells, thus reinforcing the pro-stemness role of NOTCH1 signaling in osteosarcoma. When osteosarcoma cells were challenged with EC-8042, we found that overexpression of NOTCH1 resulted in impaired ability of the MTM analog to target CSCs-enriched tumorspheres and more importantly, in worse response to the drug *in vivo*. On the other hand, the silencing of HES1 increased the

potential of EC-8042 to eliminate tumorsphere forming cells and reduce the ability of tumor cells to recover after the treatment. In addition, *in vivo* tumor growth of HES1-depleted cells is highly prevented by EC-8042. Altogether, these results confirmed that the inhibition of NOTCH1 is a key mechanism of action for this drug in osteosarcomas. By inhibiting this signaling, EC-8042 is able to target CSCs and hinder tumor growth *in vivo*. In line with this results, previous studies using  $\gamma$ -secretase inhibitors to treat osteosarcoma cells also showed that inhibition of NOTCH signaling resulted in reduced CSC activity and the reversion of resistant phenotypes [42, 44, 45].

## CONCLUSIONS

Here we show that EC-8042 is an efficient multi-target repressor of NOTCH1 signaling in sarcomas. Through gain and/or loss of function experiments of NOTCH1 and HES1 in osteosarcoma models we demonstrated that the anti-CSC activity of EC-8042 and the *in vivo* response to this drug highly rely on its ability to repress this pathway. Finally, we found that NOTCH1 expression was associated to increased tumor aggressiveness and poorer outcome of sarcoma patients. Altogether, these results suggest that EC-8042 could represent a suitable therapeutic option to eliminate CSCs in osteosarcomas and other tumor types where NOTCH signaling may play a pro-stemness roles.

## REFERENCES

1. Schiavone, K., et al., The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells, in Stem Cells Heterogeneity in Cancer, A. Birbrair, Editor. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 187-200.
2. Heymann, D., Bone Cancer 3rd Edition. Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside. 2021: Elsevier. 1078.
3. Brown, H.K., M. Tellez-Gabriel, and D. Heymann, Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett*, 2017. 386: p. 189-195.
4. Abarategi, A., et al., Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 3631764.

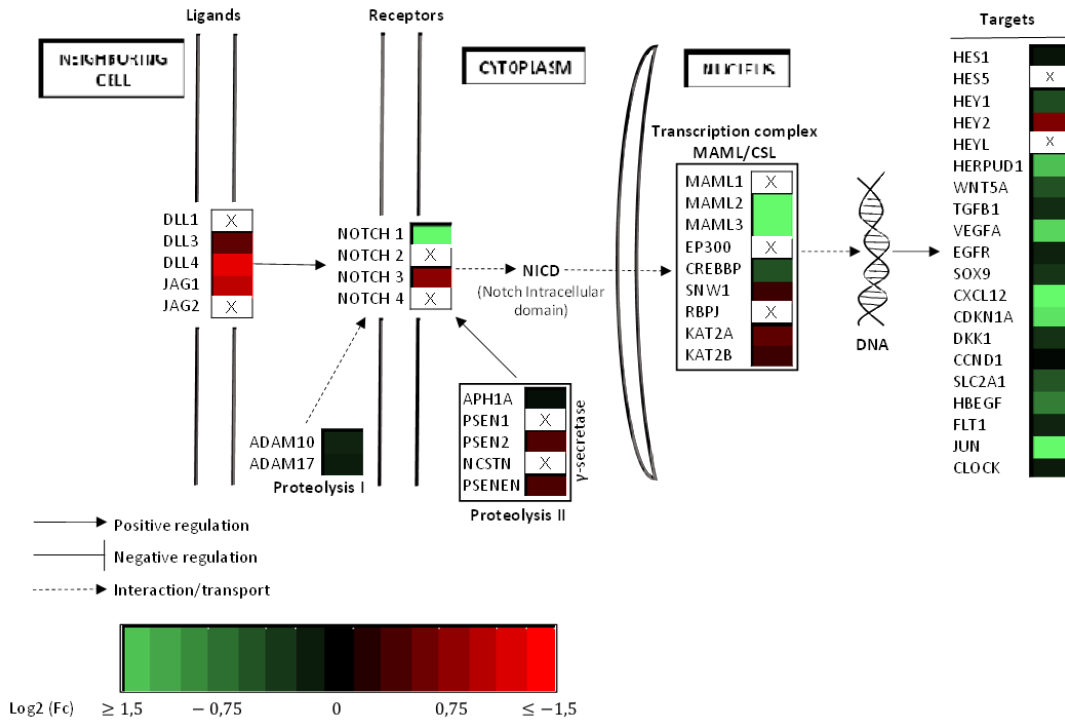
5. Hatina, J., et al., Sarcoma Stem Cell Heterogeneity, in *Stem Cells Heterogeneity - Novel Concepts*, A. Birbrair, Editor. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 95-118.
6. Estupiñán, Ó., et al., Mithramycin delivery systems to develop effective therapies in sarcomas. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021. 19(1): p. 267.
7. Dong, P., et al., Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017. 36(1): p. 150.
8. Quarni, W., et al., Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 15202.
9. Singh, D.K., et al., Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma. *Cell Rep*, 2017. 18(4): p. 961-976.
10. Vanner, R.J., et al., Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell*, 2014. 26(1): p. 33-47.
11. Méndez, C., et al., Expanding the Chemical Diversity of the Antitumoral Compound Mithramycin by Combinatorial Biosynthesis and Biocatalysis: The Quest for Mithralogs with Improved Therapeutic Window. *Planta Med*, 2015. 81(15): p. 1326-38.
12. Tornin, J., et al., Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma. *Oncotarget*, 2016. 7(21): p. 30935-50.
13. Osgood, C.L., et al., Identification of Mithramycin Analogues with Improved Targeting of the EWS-FLI1 Transcription Factor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2016. 22(16): p. 4105-4118.
14. Federico, A., et al., Mithramycin A and Mithralog EC-8042 Inhibit SETDB1 Expression and Its Oncogenic Activity in Malignant Melanoma. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2020. 18: p. 83-99.
15. Pandiella, A., et al., Antitumoral activity of the mithralog EC-8042 in triple negative breast cancer linked to cell cycle arrest in G2. *Oncotarget*, 2015. 6(32): p. 32856-32867.

16. Fernández-Guizán, A., et al., Pleiotropic Anti-Angiogenic and Anti-Oncogenic Activities of the Novel Mithralog Demycarosyl-3D-β-D-Digitoxosyl-Mithramycin SK (EC-8042). *PLOS ONE*, 2015. 10(11): p. e0140786.
17. Fernández-Guizán, A., et al., The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription. *Chem Biol Interact*, 2014. 219: p. 123-32.
18. Chasse, M.H., et al., Mithramycin induces promoter reprogramming and differentiation of rhabdoid tumor. *EMBO molecular medicine*, 2021. 13(2): p. e12640-e12640.
19. Hermida-Prado, F., et al., The SRC Inhibitor Dasatinib Induces Stem Cell-Like Properties in Head and Neck Cancer Cells that are Effectively Counteracted by the Mithralog EC-8042. *Journal of Clinical Medicine*, 2019. 8(8).
20. Shinde, D., et al., Transcriptional Reprogramming and Inhibition of Tumor-propagating Stem-like Cells by EC-8042 in ERG-positive Prostate Cancer. *European Urology Oncology*, 2019. 2(4): p. 415-424.
21. Schweer, D., et al., Mithramycin and Analogs for Overcoming Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer. *Biomedicines*, 2021. 9(1): p. 70.
22. Menendez, S.T., et al., SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(4).
23. Vizcaíno, C., S. Mansilla, and J. Portugal, Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015. 152: p. 111-124.
24. Beishline, K. and J. Azizkhan-Clifford, Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *The FEBS Journal*, 2015. 282(2): p. 224-258.
25. Miller, D.M., et al., Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA. *Am J Med Sci*, 1987. 294(5): p. 388-94.
26. Tang, Q., et al., CDH4 is a novel determinant of osteosarcoma tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*, 2018. 37(27): p. 3617-3630.

27. Hermida-Prado, F., et al., The SRC Inhibitor Dasatinib Induces Stem Cell-Like Properties in Head and Neck Cancer Cells that are Effectively Counteracted by the Mithralog EC-8042. 2019. 8(8): p. 1157.
28. Meurette, O. and P. Mehlen, Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 2018. 34(4): p. 536-548.
29. Tao, J., et al., Notch activation as a driver of osteogenic sarcoma. *Cancer Cell*, 2014. 26(3): p. 390-401.
30. Menéndez, S.T., et al., Cancer Stem Cells as a Source of Drug Resistance in Bone Sarcomas. *J Clin Med*, 2021. 10(12).
31. Engin, F., et al., Notch signaling contributes to the pathogenesis of human osteosarcomas. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(8): p. 1464-70.
32. Tanaka, M., et al., Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. *British Journal of Cancer*, 2009. 100(12): p. 1957-1965.
33. Gao, Y., L. Bai, and G. Shang, NOTCH1 promotes the malignant progression of osteosarcoma through the activation of cell division cycle 20. *Aging (Albany NY)*, 2020. 13(2): p. 2668-2680.
34. Yu, L., et al., The Notch Pathway Promotes Osteosarcoma Progression through Activation of Ephrin Reverse Signaling. *Mol Cancer Res*, 2019. 17(12): p. 2383-2394.
35. Hughes, D.P.M., How the NOTCH Pathway Contributes to the Ability of Osteosarcoma Cells to Metastasize, in *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, N. Jaffe, O.S. Bruland, and S. Bielack, Editors. 2010, Springer US: Boston, MA. p. 479-496.
36. Fang, L., et al., Analysis of changes in the expression of Notch1 and HES1 and the prognosis of osteosarcoma patients following surgery. *Oncol Lett*, 2020. 20(4): p. 29.
37. Venkatesh, V., et al., Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig*, 2018. 5: p. 5.
38. Yuan, X., et al., Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett*, 2015. 369(1): p. 20-7.

39. Takebe, N., et al., Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015. 12(8): p. 445-64.
40. Sanalkumar, R., S.B. Dhanesh, and J. James, Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010. 67(17): p. 2957-2968.
41. Alfred, V. and T. Vaccari, Mechanisms of Non-canonical Signaling in Health and Disease: Diversity to Take Therapy up a Notch?, in *Molecular Mechanisms of Notch Signaling*, T. Borggreffe and B.D. Giaimo, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 187-204.
42. Yu, L., et al., Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling. *Oncotarget*, 2016. 7(22): p. 33055-33068.
43. Lu, J., et al., MiR-26a inhibits stem cell-like phenotype and tumor growth of osteosarcoma by targeting Jagged1. *Oncogene*, 2017. 36(2): p. 231-241.
44. Dai, G., et al., Notch pathway inhibition using DAPT, a  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI), enhances the antitumor effect of cisplatin in resistant osteosarcoma. *Molecular Carcinogenesis*, 2019. 58(1): p. 3-18.
45. Yang, J., et al., Notch signaling is important for epithelial-mesenchymal transition induced by low concentrations of doxorubicin in osteosarcoma cell lines. *Oncol Lett*, 2017. 13(4): p. 2260-2268.

## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Figure S1:** Effect of EC-8042 treatment on NOTCH1 pathway in 143B osteosarcoma cell line. NOTCH1 signaling pathway scheme showing upregulation or downregulation levels of relevant components of the pathway in 143B cells treated with EC-8042 in comparison with control cells. Green and red colors indicate significant downregulation and upregulation, respectively. Targets with non-significant p-values are labeled with an X.



### 3. Discusión general y consideraciones futuras

Los resultados obtenidos en los diferentes artículos expuestos en este compendio establecen unas bases prometedoras de cara al futuro desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de sarcomas. Considerándolos en conjunto, es posible plantear nuevas vías de investigación que pueden resultar de gran interés para avanzar en este objetivo.

El primer aspecto conjunto que se debe destacar es la capacidad de los agentes propuestos en este trabajo para inhibir simultáneamente múltiples dianas y rutas de señalización estrechamente asociadas al desarrollo neoplásico en sarcomas. Esta característica está íntimamente vinculada con el elevado potencial antineoplásico que mostraron. Un ejemplo de esta afirmación es la actividad antitumoral que muestran la MTM, estudiada en los **Artículos 2 y 3** de este compendio, y su análogo EC-8042, presentado en el **Artículo 4**. La actividad antineoplásica de estos agentes está relacionada, en parte, con su capacidad de inhibir diversas dianas moduladas por el factor de transcripción SP1, entre las que se incluye VEGF. Curiosamente, estudios recientes se han centrado en la inhibición específica de VEGF mediante los inhibidores apatinib y pazopanib para el tratamiento de STSs [288, 582]. Si bien los resultados obtenidos por estos inhibidores fueron positivos, no mostraron una mayor eficacia que la quimioterapia convencional empleada como tratamiento de primera línea contra sarcomas. En comparación, es posible asociar la capacidad del EC-8042 y la MTM de inhibir múltiples dianas oncogénicas con su potente actividad antineoplásica. En este contexto se debe mencionar que estudios previos ya han vinculado la modulación alterada de SP1 con el desarrollo neoplásico y con la activación de mecanismos de resistencia en varias histologías de sarcomas [583-585] y han descrito su inhibición como un mecanismo de acción clave del EC-8042 contra STSs [42, 569]. Otra muestra de inhibición múltiple de dianas oncogénicas se observó en el **Artículo 1** de este compendio con el caso del inhibidor multiquinasas EC-70124, que, si bien presentó una actividad limitada contra liposarcomas mixoides en los ensayos *in vivo*, su capacidad para evitar y/o inhibir algunos de los principales mecanismos de resistencia de estos tumores evidenció su enorme potencial como parte de una terapia combinada, idea que quedó reforzada considerando los resultados obtenidos en los tratamientos combinatorios con doxorubicina.

Partiendo de los datos expuestos y teniendo en cuenta lo observado en los artículos relacionados con la encapsulación (**Artículo 2 y Artículo 3**), resulta razonable plantear el

uso de nanotransportadores como parte de las terapias propuestas. De esta manera, la encapsulación de uno o varios compuestos permitiría mejorar el índice terapéutico del tratamiento, además de potenciar las posibles sinergias existentes gracias al control de la liberación de cada uno. En los artículos mencionados, se trabajó en la encapsulación de la MTM con el fin de reducir su toxicidad sistémica y aumentar la efectividad del compuesto. Así, se diseñaron seis nanotransportadores diferentes (dos tipos de transfersomas, liposomas, PNPs de PLGA y de PLA, e hidrogeles) los cuales mostraron unas características adecuadas para la encapsulación del compuesto: i) ser inocuos y biodegradables en el organismos, ii) entrar en un rango de tamaños (100-200 nm) que permitiera la distribución y retención de la nanopartícula en la región tumoral, además de esquivar el sistema inmune y el filtrado renal, iii) mostrar una dispersidad de tamaños baja, y iv) presentar EEs compatibles con la encapsulación del compuesto. Considerando los prometedores resultados obtenidos tras la encapsulación de la MTM, en los que se mantuvo la actividad del compuesto en ensayos *in vitro* y se mejoró su efectividad a la vez que se reducía su toxicidad *in vivo*, además de seguir optimizando la encapsulación de este compuesto resulta interesante plantear estrategias basadas en el uso de nanotransportadores en las diferentes terapias propuestas en este trabajo.

Tal y como se ha mencionado en apartados anteriores, son muchos los estudios que se han centrado en la encapsulación de doxorubicina para el tratamiento de varias neoplasias, existiendo a día de hoy terapias aceptadas para el uso clínico basadas en doxorubicina encapsulada en liposomas funcionalizados con polietilenglicol (Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup>). Estas han demostrado tener una menor toxicidad sistémica que el compuesto libre, siendo la base a partir de la cual se siguen desarrollando nuevos tratamientos [509, 586-588]. Un ejemplo es la terapia dirigida contra los macrófagos asociados al tumor en sarcomas, cuyos lisosomas son capaces de degradar una proporción significativa de los compuestos empleados en el tratamiento. Esta terapia está basada en la capacidad de la polietilamina de evitar la degradación asociada al pH ácido de los lisosomas, de manera que se han diseñado liposomas con doxorubicina encapsulada funcionalizados con un complejo polietilamina-colesterol-ácido siálico con los cuales se han cosechado buenos resultados en ensayos *in vivo* [589]. Resulta relevante mencionar que se ha demostrado que la encapsulación doxorubicina en nanovesículas ha logrado revertir parcialmente la resistencia a este compuesto en cáncer de colon, mediante la inhibición de la actividad de ABCB1, indicando que la propia estructura del liposoma interfiere de alguna manera en la actividad esta diana [590].

Aplicando esta estrategia a inhibidores multiquinasa como el EC-70124, algunos estudios han obtenido resultados muy interesantes. Un ejemplo de ello es la encapsulación activa de estaurosporina en liposomas mediante el empleo un gradiente de pH para obtener altas EEs y una buena retención del compuesto encapsulado. Estos sistemas lograron un incremento en la acumulación de fármacos en la región tumoral y demostraron tener una mayor actividad antineoplásica y en modelos animales de glioblastomas [591]. Resultados igualmente satisfactorios se encontraron al tratar ratones con adenocarcinomas colorrectales con sistemas nanotransportadores cargados con los inhibidores de las quinasas aurora AZD2811 y AZD1152 [592]. En estos estudios se emplearon un tipo de nanopartículas poliméricas, accurinas, en las que el agente activo se une al nanotransportador mediante emparejamiento iónico. Otro ejemplo relevante es la encapsulación de sorafenib en PNP's cargadas positivamente para el tratamiento local de neoplasias pulmonares. La administración por vía inhalatoria de estas nanopartículas logró mejorar de manera considerable la respuesta antitumoral en modelos *in vitro* y en simulaciones 3D [593]. Por otro lado, se logró aumentar la sensibilidad de modelos animales ortotópicos de adenocarcinomas de páncreas a la gencitabina tras el tratamiento con el inhibidor de RTKs N19 encapsulado en liposomas[594]. Como último ejemplo, resulta interesante mencionar el uso de liposomas fotoactivables con radiación cercana al infrarrojo gracias a su funcionalización con benzoporfirina, para la encapsulación de cabozantinib. Estos sistemas lograron mejorar la acumulación del compuesto en la región neoplásica y suprimir de manera más efectiva el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis en modelos animales con cáncer de páncreas [595].

Teniendo en cuenta los estudios que se han ido detallando, resulta procedente plantear la encapsulación de tratamientos combinados, de especial interés en terapias como la propuesta en el **Artículo 1**. Existen diversos ejemplos que demuestran que la encapsulación de varios compuestos activos es perfectamente factible. Mencionando algunos de ellos, se han empleado liposomas para la encapsulación de doxorubicina y fosfato de cloroquina, un inhibidor de la autofagia altamente relacionado con la expresión de varias bombas ABC, para el tratamiento de diferentes tumores. Así, se observó que esta terapia fue capaz de reducir el IC<sub>50</sub> de la doxorubicina en células de cáncer de mama casi cinco veces, y hasta veinte veces en modelos de leucemia mieloide aguda en comparación con la doxorubicina libre, además de mostrar una mejor acumulación celular de doxorubicina y una mayor

respuesta en tratamientos *in vivo* [596]. Algo similar ocurrió con la encapsulación de doxorubicina junto con el inhibidor de ABCB1 tariquidar en nanotransportadores sensibles a pHs ácidos de poliglicerol dentrítico y sílica mesoporosa. Este tratamiento, diseñado para actuar contra las subpoblaciones de CSCs de tumores de mama, demostró un buen efecto antineoplásico en cultivos de tumoresferas [597]. Otro ejemplo es la encapsulación de doxorubicina con el antiinflamatorio celecoxib en liposomas, que mostró un efecto anti-proliferativo sinérgico en experimentos *in vitro* con modelos de cáncer de piel [598]. Finalmente, puede mencionarse la encapsulación de doxorubicina en conjunto con la berberina en liposomas funcionalizados con polietilenglicol para el tratamiento *in vivo* de sarcomas murinos. Esta nanoformulación aumentó el efecto sinérgico de ambos compuestos en comparación con su administración sin nanovehículos [599].

Como se ha visto, la funcionalización de la superficie de los nanotransportadores resulta un recurso de gran interés para la modificación de sus características estructurales y los parámetros de biodistribución. Una de las principales estrategias en este ámbito es el recubrimiento de los nanovehículos con elementos que tiendan a interactuar de manera específica con determinados receptores, lo que permite dirigirlos contra tejidos o subpoblaciones celulares concretas que los expresen. Considerando la capacidad de la MTM y de su análogo EC-8042 para eliminar las subpoblaciones CSCs, se puede plantear su encapsulación en nanotransportadores funcionalizados con elementos que favorezcan la interacción con receptores asociados a estos fenotipos celulares. Algunos estudios centrados en la encapsulación de agentes antineoplásicos en nanotransportadores funcionalizados para favorecer la interacción con CSCs, aprovechan la expresión del receptor CD44, que presenta una gran afinidad con el ácido hialurónico y que se expresa de manera recurrente en subpoblaciones de CSCs de sarcomas y otros tipos de tumores. A modo de ejemplo, se ha encapsulado doxorubicina en micelas poliméricas sensibles a pH ácido de 6-mercaptapurina conjugadas con ácido hialurónico tiolado para el tratamiento de tumores de colon. Si bien los ensayos *in vitro* mostraron una disminución en la citotoxicidad del compuesto con respecto a la doxorubicina libre, el efecto sobre subpoblaciones CSCs fue significativamente mayor; observándose además un incremento en la inhibición del crecimiento tumoral en los ensayos *in vivo*, así como una mayor acumulación del compuesto en la región neoplásica en ensayos *ex vivo* [600]. En otro estudio, se generaron liposomas conjugados con dos tipos diferentes de aptámeros de ADN específicos para la interacción

con MUC1 y CD44 para la encapsulación de doxorubicina. El tratamiento de tumores de mama con estos nanotransportadores mostró un mayor efecto que el compuesto libre contra cultivos de tumorosferas enriquecidos en CSCs y una mayor actividad antineoplásica en modelos *in vivo* [601]. En otro ejemplo interesante, se encapsuló 3,4-difluorobencilideno de curcumina en nanomicelas de copolímeros de ácido maleico y estireno funcionalizadas con ácido hialurónico para el tratamiento de tumores de páncreas. Este tratamiento logró aumentar la capacidad del compuesto para inhibir la proliferación y la invasión tumoral e incrementó la absorción del compuesto en las subpoblaciones CSCs [602]. Según los ejemplos expuestos, la encapsulación de la MTM o del EC-8042 en nanotransportadores funcionalizados, por ejemplo, con ácido hialurónico podría ser una estrategia de gran utilidad para el tratamiento de sarcomas.

Otra estrategia en la que se debe profundizar es la funcionalización de los nanotransportadores para la interacción específica con los receptores NOTCH, como se observó en el **Artículo 4**, rutas clave en el mecanismo de acción del EC-8042 contra CSCs. Algunos estudios ya han realizado avances en este ámbito. A modo de ejemplo, se ha encapsulado el miRNA miR-35a, capaz de inhibir la expresión de NOTCH1, en PNPs de poli(ácido láctico-co-glicólico) funcionalizadas con anticuerpos contra NOTCH1 para el tratamiento de tumores de mama agresivos. De esta manera, se consiguió dirigir el tratamiento contra las subpoblaciones celulares con mayor expresión de NOTCH1 a la vez que se inhibía la actividad de estos receptores. Esta estrategia demostró buenos resultados en ensayos *in vivo* en los que se observó una reducción del crecimiento tumoral y la aparición de metástasis [603]. Las mismas PNPs desarrolladas en el estudio anterior, fueron empleadas para la encapsulación del compuesto ABT-737, con actividad inhibidora de NOTCH1 y Bcl2, para el tratamiento de tumores de mama avanzados. En este caso la inhibición de NOTCH1 por los anticuerpos mostró un efecto sinérgico con la actividad del compuesto encapsulado, de forma que se observó un mayor efecto antineoplásico y un incremento en la supervivencia en modelos animales [604].

Retomando las ventajas antes mencionadas sobre la encapsulación de compuestos en terapias combinadas y considerando la relación de NOTCH1 con los mecanismos de resistencia a determinados agentes antineoplásicos de uso convencional como la doxorubicina o el cisplatino en sarcomas [88, 105, 605], resulta interesante que, además de encapsularlo, se estudien tratamientos basados en combinaciones del EC-8042 con agentes antineoplásicos

de uso convencional. Se espera que este tratamiento combinatorio pueda tener un efecto especialmente beneficioso en aquellos tumores en los que la activación de NOTCH1 puede generar resistencias a fármacos tumorales.

Para acabar, resulta importante tener en cuenta que, más allá de los objetivos futuros expuestos en este apartado, el reto más próximo que debe afrontarse es la optimización de la administración de los nanotransportadores desarrollados en los trabajos incluidos en este compendio en más modelos animales, mejorando los resultados obtenidos, y la caracterización de su distribución en el organismo y, en especial, en las regiones neoplásicas.

En términos generales, en esta tesis doctoral se han presentado tres estrategias terapéuticas basadas en el uso de agentes antitumorales con capacidad de inhibir simultáneamente múltiples dianas asociadas al desarrollo neoplásico en sarcomas. Dichas terapias han demostrado tener un gran potencial para su posible aplicación clínica contra estos tumores en un futuro próximo. Por un lado, el EC-70124 ha probado ser un candidato idóneo para formar parte de un tratamiento combinado con quimioterapia convencional en base a su actividad antitumoral y a su capacidad de inhibir la expresión de dianas relacionadas con quimioresistencia en el tumor. Por otro lado, el ya de por sí alto potencial antineoplásico de la MTM se ha visto incrementado mediante su encapsulación a la vez que se ha logrado reducir su toxicidad sistémica *in vivo*. Finalmente, el análogo de la mitramicina EC-8042 ha demostrado tener un perfil de represión génica muy robusto vinculado a la inhibición de rutas de señalización clave en el mantenimiento de fenotipos CSCs como NOTCH1, ruta que resultó vital en el mecanismo de acción del compuesto contra estas subpoblaciones celulares.

## **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES**

---

## Conclusiones

- 1- El EC-70124 inhibe eficientemente múltiples quinasas asociadas a rutas de señalización comúnmente sobreactivadas en cáncer y presenta un efecto anti-proliferativo en sarcomas mayor que otros inhibidores multi-quinasa como la midostaurina.
- 2- Aunque su efecto como monoterapia in vivo es moderado, el EC-70124 inhibe la expresión de distintos miembros de la familia de transportadores ABC de forma que es capaz de potenciar el efecto de otros agentes antineoplásicos como la doxorubicina.
- 3- Se han diseñado distintos tipos de nanovesículas, nanopartículas poliméricas e hidrogeles con tamaños entre los 100-200 nm, inocuos, monodispersos y capaces de encapsular MTM de forma eficiente.
- 4- La MTM encapsulada en nanotransportadores retiene la capacidad de la MTM libre para reprimir la activación en sarcomas de múltiples rutas de señalización, como la controlada por el factor de transcripción SP1, relevantes para el desarrollo tumoral.
- 5- Todos los nanotransportadores de MTM desarrollados mostraron un efecto anti-proliferativo in vitro y una capacidad de erradicar subpoblaciones de CSCs en sarcomas similar a la de la MTM libre.
- 6- En comparación con el fármaco libre, la MTM encapsulada en liposomas demostró una mayor capacidad para controlar el crecimiento de sarcomas in vivo a la vez que produjo una menor toxicidad sistémica. Estos resultados indican que la encapsulación de MTM puede representar una estrategia segura y eficaz para reposicionar la MTM para el tratamiento de tumores.
- 7- El análogo de la MTM EC-8042 es capaz de inducir a una mayor modulación de la expresión génica en sarcomas que el fármaco original e inhibe de forma específica varias rutas de señalización oncogénicas relevantes como la controlada por NOTCH1.



- 8- La activación de la ruta de NOTCH1 es clave en el mantenimiento de fenotipos CSCs en osteosarcomas y la expresión nuclear de este factor se correlaciona con una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico en sarcomas.
  
- 9- EC-8042 muestra una gran capacidad para eliminar subpoblaciones de CSCs e inhibir el crecimiento tumoral en modelos de osteosarcoma. Esta actividad anti-tumoral de EC-8042 depende en gran medida de su capacidad para inhibir la ruta de NOTCH1.

## Conclusions

- 1- EC-70124 efficiently inhibits the activity of multiple kinases associated with signaling pathways commonly over-activated in cancer and has a greater anti-proliferative effect in sarcomas than other multi-kinase inhibitors such as midostaurin.
- 2- Although its effect as monotherapy *in vivo* is moderate, EC-70124 can inhibit the expression of different members of the ABC transporter family and is therefore capable of enhancing the effect of other antineoplastic agents such as doxorubicin.
- 3- Different types of nanovesicles, polymeric nanoparticles and hydrogels have been designed with sizes between 100-200 nm, innocuous, monodisperse and capable of encapsulating MTM efficiently.
- 4- MTM encapsulated in nanocarriers retains the ability of free MTM to repress activation in sarcomas of multiple signaling pathways, such as that controlled by the transcription factor SP1, relevant for tumor development.
- 5- All MTM nanocarriers developed showed an anti-proliferative effect *in vitro* and a capacity to eradicate subpopulations of CSCs in sarcomas similar to that of free MTM.
- 6- Compared with the free drug, liposome-encapsulated MTM demonstrated a greater ability to control sarcoma growth *in vivo* and was better tolerated. These results indicate that encapsulation of MTM may represent a safe and effective strategy to reposition MTM for cancer treatment.
- 7- The MTM EC-8042 analog is capable of inducing a greater modulation of gene expression in sarcomas than the original drug and specifically inhibits several relevant oncogenic signaling pathways such as that controlled by NOTCH1.
- 8- The activation of the NOTCH1 pathway is key in the maintenance of CSC phenotypes in osteosarcomas and the nuclear expression of this factor correlates with enhanced tumor aggressiveness and a worse prognosis in sarcomas.

9- EC-8042 shows a great capacity to eliminate subpopulations of CSCs and to inhibit tumor growth in osteosarcoma models. This anti-tumor activity of EC-8042 is highly dependent on its ability to inhibit the NOTCH1 pathway.

# LISTADO DE ABREVIATURAS

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>%TGI</b>	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Tumoral
<b>AEI</b>	Agencia Estatal de Investigación
<b>ALDH</b>	Aldehído Deshidrogenasa
<b>AML</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATCC</b>	Colección Americana de Cultivos Celulares
<b>BM-MSC</b>	Células Madre Mesenquimales Derivadas de Médula Ósea
<b>BSA</b>	Seroalbúmina Bovina
<b>CAF</b>	Fibroblasto Asociado a Tumor
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>CDS</b>	Condrosarcoma
<b>CFU</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>CIBERONC</b>	CIBER en Oncología
<b>CM</b>	Componente de Membrana
<b>Cho</b>	Colesterol
<b>CSC</b>	Células Madre Tumorales
<b>CTGF</b>	Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo
<b>DAB</b>	Diamononencidina
<b>DEG</b>	Genes Diferencialmente Expresados
<b>DLS</b>	Dispersión Dinámica de la Luz
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico

<b>DSL</b>	Delta/Serrate/Lag
<b>EE</b>	Eficacia de Encapsulación
<b>EIM</b>	Método de Inyección En Etanol
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesenquimal
<b>EPR</b>	Efecto de Retención y Permeabilidad Mejorada
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino
<b>FC</b>	FUS-CHOP
<b>FEDER</b>	Fondo Europeo de Desarrollo Regional
<b>FNCLCC</b>	Federación Francesa De Centros Oncológicos Integrales
<b>FOS</b>	L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina
<b>GFP</b>	Proteína Fluorescente Verde
<b>GIST</b>	Tumor del Estroma Gastrointestinal
<b>GL</b>	Glucono- $\alpha$ -Lactona
<b>GSEA</b>	Análisis de Enriquecimiento de Grupos de Genes
<b>GSI</b>	Inhibidor de la $\gamma$ -Secretasa
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HG</b>	Hidrogel
<b>HPF</b>	Campo de Alta Potencia
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>HPV</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rabano
<b>HUCA</b>	Hospital Universitario Central de Asturias

<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cancer
<b>IC</b>	Índice de Combinacion
<b>IC50</b>	Mitad de la Inhibición Máxima De La Viabilidad
<b>ISCIH</b>	Instituto de Salud Carlos III
<b>ISPA</b>	Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias
<b>Kd</b>	Constante Termodinámica de Disociación
<b>LDA</b>	Ensayo de Dilución Limitada
<b>LE</b>	Eficiencia de Carga
<b>LIP</b>	Liposoma
<b>LUM</b>	Vesículas Largas Unilamelares
<b>MAT</b>	Transicion Mesénquima-Ameboide
<b>MCFT</b>	Migliol-812
<b>mCMV</b>	Citomegalovirus
<b>MICINN</b>	Ministerio de Ciencia e Innovación
<b>MRCLS</b>	Liposarcoma Mixoide y de Células Redondeadas
<b>MSC</b>	Células Madre Mesenquimales
<b>MTM</b>	Mitramicina
<b>N1ICD</b>	Dominio Intracelular de NOTCH1
<b>NMT</b>	N-Metiltransferasa
<b>NP</b>	Nanoparticula
<b>NS-TEM</b>	Microscopía de Transmisión Electrónica con Tinción Negativa

<b>NV</b>	Nanovesicula
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina de Soja
<b>PDI</b>	Índice de Polidispersidad
<b>PEG</b>	Poli(etilenglicol)
<b>PEG</b>	Poli(etilenglicol)
<b>PI</b>	Yoduro de Propidio
<b>PLA</b>	Polilactidas
<b>PLGA</b>	Poli(lactida-co-glicolido)
<b>PNP</b>	Nanopartícula Polimerica
<b>Poli-hema</b>	Poli-2-Hidroximetacrilato
<b>PTA</b>	Solución de Ácido Fosfotúngstico
<b>PVA</b>	Poli(vinil alcohol)
<b>qPCR</b>	Reaccion en Cadena de la Polimerasa Cuantitatva
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>STR</b>	Repeticiones Cortas en Tandem
<b>RH</b>	Radio Hidrodinámico
<b>RNAseq</b>	Secuenciación de Ácido Ribonucléico
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RT-HPLC</b>	Cromatografía Líquida en Fase Reversa
<b>RT-HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
<b>RTK</b>	Receptor Tirocin Quinasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa Reversa



<b>RTV</b>	Volumen Relativo del Tumor
<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>S60</b>	Span60
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>STS</b>	Sarcoma de Tejido Blando
<b>SUV</b>	Vesículas Pequeñas Unilamelares
<b>SV40-ST</b>	Antígeno T del Virus SV40
<b>T20</b>	Tween20
<b>TFH</b>	Hidratación de Película Fina
<b>TMA</b>	Matriz de Tejido
<b>UPS</b>	Sarcoma Pleomórfico No Diferenciado
<b><math>\gamma</math>H2AX</b>	Histona $\gamma$ 2ax

# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ebers, P. and B. Ebbell, *The Papyrus Ebers, the greatest Egyptian medical document. Translated by B. Ebbell.* 1937, Levin & Munksgaard: Copenhagen; Oxford University Press: London.
2. David, A.R. and M.R. Zimmerman, *Cancer: an old disease, a new disease or something in between?* Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 728-33.
3. Edward, J.O., et al., *Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa.* South African Journal of Science, 2016. **112**(7/8).
4. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020.* 2020. **70**(1): p. 7-30.
5. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* 2018. **68**(6): p. 394-424.
6. Wilson, L.F., et al., *How many cancer cases and deaths are potentially preventable? Estimates for Australia in 2013.* Int J Cancer, 2018. **142**(4): p. 691-701.
7. Brown, K.F., et al., *The fraction of cancer attributable to modifiable risk factors in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015.* Br J Cancer, 2018. **118**(8): p. 1130-1141.
8. Islami, F., et al., *Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 31-54.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Greaves, M., *Cancer's Darwinian dilemma: an evolutionary tale in three acts.* 2015. **351**: p. h6581.
11. Alexandrov, L.B., et al., *Clock-like mutational processes in human somatic cells.* Nature Genetics, 2015. **47**(12): p. 1402-1407.
12. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers.* Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-649.
13. Laird, C.D., et al., *Hairpin-bisulfite PCR: Assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules.* 2004. **101**(1): p. 204-209.
14. Lytle, N.K., A.G. Barber, and T. Reya, *Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance.* Nat Rev Cancer, 2018. **18**(11): p. 669-680.
15. Graham, T.A. and A. Sottoriva, *Measuring cancer evolution from the genome.* J Pathol, 2017. **241**(2): p. 183-191.
16. Noguera, R., et al., *[An integral view of cancer (I). The study, classification and reprogramming of the tumoral microclimate].* Rev Esp Patol, 2019. **52**(2): p. 92-102.
17. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer.* Nature, 2011. **469**(7330): p. 314-22.
18. Nassar, D. and C. Blanpain, *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications.* Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 47-76.
19. Rycaj, K. and D.G. Tang, *Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations.* Cancer Res, 2015. **75**(19): p. 4003-11.
20. Rodriguez, R., R. Rubio, and P. Menendez, *Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells.* Cell Res, 2012. **22**(1): p. 62-77.
21. Dalerba, P., et al., *7 - Stem Cells, Cell Differentiation, and Cancer*, in *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)*, J.E. Niederhuber, et al., Editors. 2020, Content Repository Only!: Philadelphia. p. 97-107.e5.
22. Kuşoğlu, A. and Ç. Biray Avcı, *Cancer stem cells: A brief review of the current status.* Gene, 2019. **681**: p. 80-85.

23. Ito, T., et al., *Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi*. Nature, 2010. **466**(7307): p. 765-8.
24. Skoda, J. and R. Veselska, *Cancer stem cells in sarcomas: Getting to the stemness core*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018. **1862**(10): p. 2134-2139.
25. Medema, J.P., *Cancer stem cells: The challenges ahead*. Nature Cell Biology, 2013. **15**(4): p. 338-344.
26. Gopalan, V., F. Islam, and A.K. Lam, *Surface Markers for the Identification of Cancer Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2018. **1692**: p. 17-29.
27. Jiang, W., et al., *The implications of cancer stem cells for cancer therapy*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(12): p. 16636-57.
28. Henderson, T., et al., *Alterations in cancer stem-cell marker CD44 expression predict oncologic outcome in soft-tissue sarcomas*. The Journal of surgical research, 2018. **223**: p. 207-214.
29. Genadry, K.C., et al., *Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview*. 2018. **8**(475).
30. Yang, L., et al., *Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020. **5**(1): p. 8.
31. Rodríguez, R., et al., *Chapter 28 - Cancer stem cells and clonal evolution in bone sarcomas*, in *Bone Cancer (Third Edition)*, D. Heymann, Editor. 2022, Academic Press. p. 371-391.
32. Zhou, L., et al., *Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay*. Cell Biology and Toxicology, 2019. **35**(2): p. 161-177.
33. Abbaszadegan, M.R., et al., *Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review*. J Cell Physiol, 2017. **232**(8): p. 2008-2018.
34. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nature reviews. Clinical oncology, 2017. **14**(10): p. 611-629.
35. Jariyal, H., et al., *Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization*. Stem Cell Reviews and Reports, 2019. **15**(6): p. 755-773.
36. Jerabek, S., et al., *OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(3): p. 138-54.
37. Wang, Y.-J. and M. Herlyn, *The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells*. American journal of physiology. Cell physiology, 2015. **309**(11): p. C709-C718.
38. Gwak, J.M., et al., *Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance*. Oncotarget, 2017. **8**(22): p. 36305-36318.
39. Chen, Y.-C., et al., *Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells*. PloS one, 2008. **3**(7): p. e2637-e2637.
40. Skoda, J., et al., *Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 9535-48.
41. Basu-Roy, U., et al., *Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas*. Oncogene, 2012. **31**(18): p. 2270-82.
42. Menendez, S.T., et al., *SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications*. Cancers, 2020. **12**(4): p. 964.
43. Boumahdi, S., et al., *SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma*. Nature, 2014. **511**(7508): p. 246-250.
44. Smith, R.C.G., et al., *Nanog Fluctuations in Embryonic Stem Cells Highlight the Problem of Measurement in Cell Biology*. Biophys J, 2017. **112**(12): p. 2641-2652.
45. Lin, T., Y.Q. Ding, and J.M. Li, *Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. Med Oncol, 2012. **29**(2): p. 878-85.

46. Lu, Y., et al., *Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells*. *Cancer Lett*, 2013. **340**(1): p. 113-23.
47. Zhang, J., et al., *SPOP Promotes Nanog Destruction to Suppress Stem Cell Traits and Prostate Cancer Progression*. *Dev Cell*, 2019. **48**(3): p. 329-344.e5.
48. Wang, X., et al., *AMPK Promotes SPOP-Mediated NANOG Degradation to Regulate Prostate Cancer Cell Stemness*. *Dev Cell*, 2019. **48**(3): p. 345-360.e7.
49. Shen, Y., T.J. Chen, and H.D. Lacorazza, *Novel tumor-suppressor function of KLF4 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Exp Hematol*, 2017. **53**: p. 16-25.
50. Yasunaga, J., et al., *Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia*. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 6002-9.
51. Tien, Y.-T., et al., *Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells*. *The Veterinary Journal*, 2015. **205**.
52. Bretones, G., M.D. Delgado, and J. León, *Myc and cell cycle control*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1849**(5): p. 506-16.
53. Dang, C.V., *MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(8).
54. Date, Y. and K. Ito, *Oncogenic RUNX3: A Link between p53 Deficiency and MYC Dysregulation*. *Mol Cells*, 2020. **43**(2): p. 176-181.
55. Bledsoe, K.L., et al., *RUNX3 facilitates growth of Ewing sarcoma cells*. *Journal of cellular physiology*, 2014. **229**(12): p. 2049-2056.
56. Venkatesh, V., et al., *Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells*. *Stem Cell Investig*, 2018. **5**: p. 5.
57. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. *Science*, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
58. Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl, *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. *Development*, 2011. **138**(17): p. 3593-612.
59. Androutsellis-Theotokis, A., et al., *Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo*. *Nature*, 2006. **442**(7104): p. 823-6.
60. Bigas, A. and C. Porcheri, *Notch and Stem Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1066**: p. 235-263.
61. Patel, N.S., et al., *Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8690-7.
62. Ohishi, K., B. Varnum-Finney, and I.D. Bernstein, *The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis*. *Int J Hematol*, 2002. **75**(5): p. 449-59.
63. Hilton, M.J., et al., *Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation*. *Nature Medicine*, 2008. **14**(3): p. 306-314.
64. Deregowski, V., et al., *Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(10): p. 6203-10.
65. McManus, M.M., K.R. Weiss, and D.P. Hughes, *Understanding the role of Notch in osteosarcoma*. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **804**: p. 67-92.
66. Brzozowa-Zasada, M., et al., *Notch and its oncogenic activity in human malignancies*. *European surgery : ACA : Acta chirurgica Austriaca*, 2017. **49**(5): p. 199-209.
67. Lamar, E., et al., *Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway*. *Genes & development*, 2001. **15**(15): p. 1885-1899.
68. Aster, J.C., W.S. Pear, and S.C. Blacklow, *The Varied Roles of Notch in Cancer*. *Annual review of pathology*, 2017. **12**: p. 245-275.
69. Meisel, C.T., C. Porcheri, and T.A. Mitsiadis, *Cancer Stem Cells, Quo Vadis? The Notch Signaling Pathway in Tumor Initiation and Progression*. *Cells*, 2020. **9**(8): p. 1879.
70. Bannani-Baiti, I.M., et al., *Notch signalling is off and is uncoupled from HES1 expression in Ewing's sarcoma*. *J Pathol*, 2011. **225**(3): p. 353-63.

71. Andersen, P., et al., *Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(5): p. 257-65.
72. Hayashi, Y., et al., *A novel non-canonical Notch signaling regulates expression of synaptic vesicle proteins in excitatory neurons*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 23969.
73. Lee, K.S., et al., *Roles of PINK1, mTORC2, and mitochondria in preserving brain tumor-forming stem cells in a noncanonical Notch signaling pathway*. Genes Dev, 2013. **27**(24): p. 2642-7.
74. Li, L., et al., *Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy*. Med Oncol, 2017. **34**(10): p. 180.
75. Brzozowa-Zasada, M., et al., *Notch signalling pathway as an oncogenic factor involved in cancer development*. Contemporary oncology (Poznan, Poland), 2016. **20**(4): p. 267-272.
76. Nowell, C.S. and F. Radtke, *Notch as a tumour suppressor*. Nature Reviews Cancer, 2017. **17**(3): p. 145-159.
77. Kontomanolis, E.N., et al., *The Notch Pathway in Breast Cancer Progression*. TheScientificWorldJournal, 2018. **2018**: p. 2415489-2415489.
78. Locatelli, M. and G. Curigliano, *Notch inhibitors and their role in the treatment of triple negative breast cancer: promises and failures*. Curr Opin Oncol, 2017. **29**(6): p. 411-427.
79. McCarter, A.C., Q. Wang, and M. Chiang, *Notch in Leukemia*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1066**: p. 355-394.
80. Xu, X., et al., *Activation of Notch signal pathway is associated with a poorer prognosis in acute myeloid leukemia*. Med Oncol, 2011. **28 Suppl 1**: p. S483-9.
81. Rose, S.L., et al., *Notch 1 signaling is active in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **117**(1): p. 130-3.
82. Zhang, Y., et al., *Notch1 regulates the growth of human colon cancers*. Cancer, 2010. **116**(22): p. 5207-18.
83. Curry, C.L., et al., *Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells*. Oncogene, 2005. **24**(42): p. 6333-6344.
84. Ignatius, M.S., et al., *The NOTCH1/SNAIL1/MEF2C Pathway Regulates Growth and Self-Renewal in Embryonal Rhabdomyosarcoma*. Cell Rep, 2017. **19**(11): p. 2304-2318.
85. Francis, P., et al., *Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 73.
86. Farah, E., et al., *NOTCH signaling is activated in and contributes to resistance in enzalutamide-resistant prostate cancer cells*. 2019. **294**(21): p. 8543-8554.
87. Xiao, W., et al., *Notch signaling plays a crucial role in cancer stem-like cells maintaining stemness and mediating chemotaxis in renal cell carcinoma*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2017. **36**(1): p. 41-41.
88. Yang, J., et al., *Notch signaling is important for epithelial-mesenchymal transition induced by low concentrations of doxorubicin in osteosarcoma cell lines*. Oncol Lett, 2017. **13**(4): p. 2260-2268.
89. Tao, J., et al., *Notch activation as a driver of osteogenic sarcoma*. Cancer Cell, 2014. **26**(3): p. 390-401.
90. Yu, L., et al., *Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 33055-33068.
91. Yu, L., et al., *The Notch Pathway Promotes Osteosarcoma Progression through Activation of Ephrin Reverse Signaling*. Molecular Cancer Research, 2019. **17**(12): p. 2383.
92. Siebel, C. and U. Lendahl, *Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease*. Physiol Rev, 2017. **97**(4): p. 1235-1294.
93. Westhoff, B., et al., *Alterations of the Notch pathway in lung cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(52): p. 22293.

94. Rampias, T., et al., *A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer*. Nat Med, 2014. **20**(10): p. 1199-205.
95. Konstantakou, E.G., et al., *Deep-proteome mapping of WM-266-4 human metastatic melanoma cells: From oncogenic addiction to druggable targets*. PLOS ONE, 2017. **12**(2): p. e0171512.
96. Mao, L., et al.,  *$\gamma$ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma*. 2018. **142**(5): p. 999-1009.
97. Jia, D., et al., *NOTCH2/NOTCH3/DLL3/MAML1/ADAM17 signaling network is associated with ovarian cancer*. Oncol Lett, 2019. **17**(6): p. 4914-4920.
98. Rose, S.L., *Notch signaling pathway in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2009. **19**(4): p. 564-6.
99. Indraccolo, S., et al., *Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1314-23.
100. Wang, C.Y., et al., *Hedgehog and Notch signaling regulate self-renewal of undifferentiated pleomorphic sarcomas*. Cancer Res, 2012. **72**(4): p. 1013-22.
101. Rajakulendran, N., et al., *Wnt and Notch signaling govern self-renewal and differentiation in a subset of human glioblastoma stem cells*. 2019. **33**(9-10): p. 498-510.
102. Hu, M., et al., *IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation down-regulates miR-506 expression to promotes osteosarcoma cell growth through JAG1*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **95**: p. 1147-1155.
103. Lei, X., et al., *The FDA-approved natural product dihydroergocristine reduces the production of the Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides*. Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 16541.
104. Takebe, N., et al., *Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(8): p. 445-64.
105. Dai, G., et al., *Notch pathway inhibition using DAPT, a  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI), enhances the antitumor effect of cisplatin in resistant osteosarcoma*. Molecular Carcinogenesis, 2019. **58**(1): p. 3-18.
106. Pant, S., et al., *A first-in-human phase I study of the oral Notch inhibitor, LY900009, in patients with advanced cancer*. Eur J Cancer, 2016. **56**: p. 1-9.
107. Messersmith, W.A., et al., *A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral  $\gamma$ -secretase inhibitor PF-03084014*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 60-7.
108. Locatelli, M.A., et al., *Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 2320-2328.
109. Mir, O., et al., *Notch pathway inhibition with LY3039478 in soft tissue sarcoma and gastrointestinal stromal tumours*. Eur J Cancer, 2018. **103**: p. 88-97.
110. Xu, R., et al., *Molecular and Clinical Effects of Notch Inhibition in Glioma Patients: A Phase 0/I Trial*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2016. **22**(19): p. 4786-4796.
111. Diaz-Padilla, I., et al., *A phase Ib combination study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, and temsirolimus in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2013. **31**(5): p. 1182-91.
112. Sahebjam, S., et al., *A phase I study of the combination of ro4929097 and cediranib in patients with advanced solid tumours (PJC-004/NCI 8503)*. Br J Cancer, 2013. **109**(4): p. 943-9.
113. Lee, S.M., et al., *Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933*. Cancer, 2015. **121**(3): p. 432-440.

114. Cook, N., et al., *A phase I trial of the  $\gamma$ -secretase inhibitor MK-0752 in combination with gemcitabine in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Br J Cancer*, 2018. **118**(6): p. 793-801.
115. Falchook, G.S., et al., *Phase I study of MEDI0639 in patients with advanced solid tumors*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(15\_suppl): p. 3024-3024.
116. McCaw, T.R., et al., *Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance*. *The oncologist*, 2021. **26**(4): p. e608-e621.
117. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* *Nature reviews. Drug discovery*, 2014. **13**(7): p. 513-532.
118. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 767-79.
119. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(11): p. 1461-1473.
120. Lee, S.H., et al., *Wnt/ $\beta$ -catenin signalling maintains self-renewal and tumourigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4*. *J Pathol*, 2014. **234**(1): p. 99-107.
121. Mao, J., et al., *Roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment*. *Cell Death & Disease*, 2014. **5**(1): p. e1039-e1039.
122. Cochrane, C.R., et al., *Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells*. *Cancers*, 2015. **7**(3): p. 1554-1585.
123. Petrova, R. and A.L. Joyner, *Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair*. *Development*, 2014. **141**(18): p. 3445-57.
124. Foulkes, W.D., et al., *Cancer Surveillance in Gorlin Syndrome and Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome*. *Clinical Cancer Research*, 2017. **23**(12): p. e62.
125. Memmi, E.M., et al., *p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(11): p. 3499-504.
126. Guo, E., H. Liu, and X. Liu, *Overexpression of SCUBE2 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion in Glioma Cells*. *Oncol Res*, 2017. **25**(3): p. 437-444.
127. Weiss, A. and L. Attisano, *The TGFbeta superfamily signaling pathway*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013. **2**(1): p. 47-63.
128. Kaowinn, S., et al., *Cancer upregulated gene 2 (CUG2), a novel oncogene, promotes stemness-like properties via the NPM1-TGF- $\beta$  signaling axis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019. **514**(4): p. 1278-1284.
129. Xia, W., et al., *Smad inhibitor induces CSC differentiation for effective chemosensitization in cyclin D1- and TGF- $\beta$ /Smad-regulated liver cancer stem cell-like cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(24): p. 38811-38824.
130. Zhang, Q., M.J. Lenardo, and D. Baltimore, *30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology*. *Cell*, 2017. **168**(1): p. 37-57.
131. Kaltschmidt, C., et al., *A Role for NF- $\kappa$ B in Organ Specific Cancer and Cancer Stem Cells*. *Cancers*, 2019. **11**(5): p. 655.
132. Brown, M., et al., *NF-kappaB in carcinoma therapy and prevention*. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2008. **12**(9): p. 1109-1122.
133. Wang, D., et al., *Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(7): p. 1884-1895.e4.
134. Zhang, L., et al., *CCL21/CCR7 Axis Contributed to CD133+ Pancreatic Cancer Stem-Like Cell Metastasis via EMT and Erk/NF- $\kappa$ B Pathway*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0158529.



135. Luo, N. and J.M. Balko, *Role of JAK-STAT Pathway in Cancer Signaling*, in *Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine*, S. Badve and G.L. Kumar, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 311-319.
136. Stine, R.R. and E.L. Matunis, *JAK-STAT signaling in stem cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **786**: p. 247-67.
137. Yang, L., et al., *IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF- $\kappa$ B/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer*. *Int J Cancer*, 2019. **145**(4): p. 1099-1110.
138. Dolatabadi, S., et al., *JAK-STAT signalling controls cancer stem cell properties including chemotherapy resistance in myxoid liposarcoma*. *Int J Cancer*, 2019. **145**(2): p. 435-449.
139. Chow, W.A., *Chondrosarcoma: biology, genetics, and epigenetics*. *F1000Res*, 2018. **7**.
140. Deng, J., et al., *Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 618.
141. Chang, L., et al., *Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**(10): p. e875.
142. Fitzgerald, T.L., et al., *Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells*. *Adv Biol Regul*, 2015. **59**: p. 65-81.
143. Chen, W.J. and R.S. Huang, *Low-folate stress reprograms cancer stem cell-like potentials and bioenergetics metabolism through activation of mTOR signaling pathway to promote in vitro invasion and in vivo tumorigenicity of lung cancers*. *J Nutr Biochem*, 2018. **53**: p. 28-38.
144. Nishitani, S., et al., *Branched chain amino acid suppresses hepatocellular cancer stem cells through the activation of mammalian target of rapamycin*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e82346.
145. Samuels, Y., et al., *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. *Science*, 2004. **304**(5670): p. 554.
146. Asati, V., D.K. Mahapatra, and S.K. Bharti, *PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives*. *Eur J Med Chem*, 2016. **109**: p. 314-41.
147. Murthy, D., K.S. Attri, and P.K. Singh, *Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and Therapeutics*. *Frontiers in physiology*, 2018. **9**: p. 335-335.
148. Turdo, A., et al., *Cancer Stem Cells: From Birth to Death*, in *Cancer Stem Cell Resistance to Targeted Therapy*, C. Maccalli, M. Todaro, and S. Ferrone, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 1-30.
149. Mo, J.S., H.W. Park, and K.L. Guan, *The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(6): p. 642-56.
150. Zanconato, F., M. Cordenonsi, and S. Piccolo, *YAP/TAZ at the Roots of Cancer*. *Cancer Cell*, 2016. **29**(6): p. 783-803.
151. Orr, B.A., et al., *Yes-associated protein 1 is widely expressed in human brain tumors and promotes glioblastoma growth*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2011. **70**(7): p. 568-577.
152. Hu, X., et al., *Overexpression of YAP1 is correlated with progression, metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma*. *Pathol Oncol Res*, 2014. **20**(4): p. 805-11.
153. Jeong, M., et al., *Loss of Dnmt3a Immortalizes Hematopoietic Stem Cells In Vivo*. *Cell reports*, 2018. **23**(1): p. 1-10.

154. Hájková, H., et al., *Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation*. *Leuk Res*, 2012. **36**(9): p. 1128-33.
155. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35** **Suppl**: p. S244-s275.
156. Tellez-Gabriel, M., et al., *The Challenges of Detecting Circulating Tumor Cells in Sarcoma*. *Frontiers in oncology*, 2016. **6**: p. 202-202.
157. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020. **5**(1): p. 28.
158. Bakhoun, S.F., et al., *Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response*. *Nature*, 2018. **553**(7689): p. 467-472.
159. Carnero, A. and M. Lleonart, *The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution*. *Bioessays*, 2016. **38** **Suppl 1**: p. S65-74.
160. Tasdogan, A., et al., *Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential*. *Nature*, 2020. **577**(7788): p. 115-120.
161. Birkbak, N.J. and N. McGranahan, *Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis*. *Cancer Cell*, 2020. **37**(1): p. 8-19.
162. Cheung, K.J. and A.J. Ewald, *A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters*. *Science*, 2016. **352**(6282): p. 167.
163. Agliano, A., A. Calvo, and C. Box, *The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis*. *Seminars in Cancer Biology*, 2017. **44**: p. 25-42.
164. Choo, S., et al., *Reactivation of TWIST1 contributes to Ewing sarcoma metastasis*. *Pediatr Blood Cancer*, 2018. **65**(1).
165. Yang, G., J. Yuan, and K. Li, *EMT transcription factors: implication in osteosarcoma*. *Med Oncol*, 2013. **30**(4): p. 697.
166. Wakefield, L.M. and C.S. Hill, *Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(5): p. 328-41.
167. Bleau, A.M., et al., *Metastatic dormancy: a complex network between cancer stem cells and their microenvironment*. *Histol Histopathol*, 2014. **29**(12): p. 1499-510.
168. Peinado, H., et al., *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(5): p. 302-317.
169. Chen, X., et al., *RANKL signaling in bone marrow mesenchymal stem cells negatively regulates osteoblastic bone formation*. *Bone Res*, 2018. **6**: p. 34.
170. Tornin, J., et al., *FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway*. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2018. **20**(1): p. 44-56.
171. Zöller, M., *CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?* *Nature Reviews Cancer*, 2011. **11**(4): p. 254-267.
172. Hatina, J., et al., *Sarcoma Stem Cell Heterogeneity*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1123**: p. 95-118.
173. Wong, A.D. and P.C. Searson, *Mitosis-Mediated Intravasation in a Tissue-Engineered Tumor-Microvessel Platform*. *Cancer Res*, 2017. **77**(22): p. 6453-6461.
174. Denais, C.M., et al., *Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration*. *Science*, 2016. **352**(6283): p. 353-8.
175. Reymond, N., B.B. d'Água, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(12): p. 858-70.
176. Lee, C.-k., et al., *Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation*. *Science*, 2019. **363**(6427): p. 644.
177. Tan, D.S.P. and S.B. Kaye, *Transcoelomic Metastasis*, in *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Editor. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-6.

178. Hamidi, H. and J. Ivaska, *Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(9): p. 533-548.
179. Banyard, J. and D.R. Bielenberg, *The role of EMT and MET in cancer dissemination*. Connective tissue research, 2015. **56**(5): p. 403-413.
180. Wang, J.J., K.F. Lei, and F. Han, *Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(12): p. 3855-3864.
181. Janssen, L.M.E., et al., *The immune system in cancer metastasis: friend or foe?* J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 79.
182. Pardoll, D., *Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention*. Semin Oncol, 2015. **42**(4): p. 523-38.
183. Maccalli, C., et al., *The role of cancer stem cells in the modulation of anti-tumor immune responses*. Semin Cancer Biol, 2018. **53**: p. 189-200.
184. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
185. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
186. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-421.
187. Greaves, M., *Evolutionary determinants of cancer*. Cancer discovery, 2015. **5**(8): p. 806-820.
188. Vasan, N., J. Baselga, and D.M. Hyman, *A view on drug resistance in cancer*. Nature, 2019. **575**(7782): p. 299-309.
189. Shaked, Y., *Balancing efficacy of and host immune responses to cancer therapy: the yin and yang effects*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(10): p. 611-26.
190. Hill, B.S., et al., *Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer*. Semin Cancer Biol, 2020. **60**: p. 202-213.
191. Steinbichler, T.B., et al., *Therapy resistance mediated by cancer stem cells*. Semin Cancer Biol, 2018. **53**: p. 156-167.
192. Kleffel, S. and T. Schatton, *Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin?* Adv Exp Med Biol, 2013. **734**: p. 145-79.
193. Holtz, M., S.J. Forman, and R. Bhatia, *Growth factor stimulation reduces residual quiescent chronic myelogenous leukemia progenitors remaining after imatinib treatment*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1113-20.
194. Sansone, P., et al., *Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(43): p. E9066-e9075.
195. Dai, L., et al., *Fibroblasts in cancer dormancy: foe or friend?* Cancer Cell International, 2021. **21**(1): p. 184.
196. Sosa, M.S., et al., *Regulation of tumor cell dormancy by tissue microenvironments and autophagy*. Advances in experimental medicine and biology, 2013. **734**: p. 73-89.
197. Schlereth, K., et al., *The transcriptomic and epigenetic map of vascular quiescence in the continuous lung endothelium*. Elife, 2018. **7**.
198. Chomel, J.C. and A.G. Turhan, *Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy*. Oncotarget, 2011. **2**(9): p. 713-27.
199. Almog, N., et al., *Consensus micro RNAs governing the switch of dormant tumors to the fast-growing angiogenic phenotype*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44001.
200. Manjili, M.H., *The inherent premise of immunotherapy for cancer dormancy*. Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 6745-9.

201. Codony-Servat, J. and R. Rosell, *Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions*. *Transl Lung Cancer Res*, 2015. **4**(6): p. 689-703.
202. Begicevic, R.-R. and M. Falasca, *ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(11): p. 2362.
203. Salerno, M., et al., *Impairment of lysosomal activity as a therapeutic modality targeting cancer stem cells of embryonal rhabdomyosarcoma cell line RD*. *PLoS one*, 2014. **9**(10): p. e110340-e110340.
204. Skvortsova, I., et al., *Radiation resistance: Cancer stem cells (CSCs) and their enigmatic pro-survival signaling*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35**: p. 39-44.
205. Ogawa, K., et al., *Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(3): p. 747-54.
206. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
207. Shahar, N. and S. Larisch, *Inhibiting the inhibitors: Targeting anti-apoptotic proteins in cancer and therapy resistance*. *Drug Resistance Updates*, 2020. **52**: p. 100712.
208. Suvarna, V., V. Singh, and M. Murahari, *Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy*. *European Journal of Pharmacology*, 2019. **862**: p. 172655.
209. Hui, J.Y., *Epidemiology and Etiology of Sarcomas*. *Surg Clin North Am*, 2016. **96**(5): p. 901-14.
210. Stiller, C.A., et al., *Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(3): p. 684-95.
211. Roberts, R.D., et al., *Provocative questions in osteosarcoma basic and translational biology: A report from the Children's Oncology Group*. *Cancer*, 2019. **125**(20): p. 3514-3525.
212. Dancsok, A.R., K. Asleh-Aburaya, and T.O. Nielsen, *Advances in sarcoma diagnostics and treatment*. *Oncotarget*, 2017. **8**(4): p. 7068-7093.
213. Abarrategi, A., et al., *Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 3631764.
214. Li, Y., et al., *Evidence for Kaposi Sarcoma Originating from Mesenchymal Stem Cell through KSHV-induced Mesenchymal-to-Endothelial Transition*. *Cancer Res*, 2018. **78**(1): p. 230-245.
215. Lin, Y.-H., et al., *Osteosarcoma: Molecular Pathogenesis and iPSC Modeling*. *Trends in molecular medicine*, 2017. **23**(8): p. 737-755.
216. Rodriguez, R., et al., *Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation*. *Stem Cells*, 2013. **31**(10): p. 2061-72.
217. Rodriguez, R., et al., *FUS-CHOP fusion protein expression coupled to p53 deficiency induces liposarcoma in mouse but not in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells*. *Stem Cells*, 2011. **29**(2): p. 179-92.
218. Abarrategi, A., et al., *Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies*. *Stem Cells International*, 2016. **2016**: p. 3631764.
219. Stracquandano, G., et al., *The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes*. *Nature reviews. Cancer*, 2016. **16**(4): p. 251-265.
220. Pizzo, P.A., et al., *Principles and practice of pediatric oncology*. 2016.
221. Thoenen, E., A. Curl, and T. Iwakuma, *TP53 in bone and soft tissue sarcomas*. *Pharmacol Ther*, 2019. **202**: p. 149-164.
222. Bousquet, M., et al., *Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(4): p. 738-44.

223. Han, I., et al., *Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Is Related to Their Intrinsic Mechanical Properties*. International neurourology journal, 2017. **21**(Suppl 1): p. S24-S31.
224. Guneta, V., et al., *Comparative study of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in similar microenvironmental conditions*. Exp Cell Res, 2016. **348**(2): p. 155-164.
225. Almalki, S.G. and D.K. Agrawal, *Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells*. Differentiation, 2016. **92**(1-2): p. 41-51.
226. Goeman, F., S. Strano, and G. Blandino, *MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network*. Int Rev Cell Mol Biol, 2017. **333**: p. 51-90.
227. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells*. Genes & development, 2010. **24**(9): p. 916-932.
228. Vilas, J.M., et al., *Transcriptional regulation of Sox2 by the retinoblastoma family of pocket proteins*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 2992-3002.
229. Artigas, N., et al., *p53 inhibits SP7/Osterix activity in the transcriptional program of osteoblast differentiation*. Cell Death Differ, 2017. **24**(12): p. 2022-2031.
230. Martinez-Sanchez, A., K.A. Dudek, and C.L. Murphy, *Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145)*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 916-24.
231. Maurizi, G., et al., *Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma*. Oncogene, 2018. **37**(33): p. 4626-4632.
232. Kim, J.R., et al., *Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74738.
233. Krause, U., et al., *An unexpected role for a Wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity*. Cell death & disease, 2014. **5**(2): p. e1093-e1093.
234. Matushansky, I., et al., *Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3248-57.
235. Cossetti, C., et al., *Notch Signaling in Pediatric Soft Tissue Sarcoma*, in *Targeting Notch in Cancer: From the Fruit Fly to the Clinic*, L. Miele and S. Artavanis-Tsakonas, Editors. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 277-312.
236. Basu-Roy, U., et al., *PPAR $\gamma$  agonists promote differentiation of cancer stem cells by restraining YAP transcriptional activity*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 60954-60970.
237. Schiavone, K., et al., *The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1139**: p. 187-200.
238. Rodríguez-Núñez, P., et al., *Hippo pathway effectors YAP1/TAZ induce an EWS-FLI1-opposing gene signature and associate with disease progression in Ewing sarcoma*. J Pathol, 2020. **250**(4): p. 374-386.
239. Eid, J.E. and C.B. Garcia, *Reprogramming of mesenchymal stem cells by oncogenes*. Semin Cancer Biol, 2015. **32**: p. 18-31.
240. Martins-Neves, S.R., et al., *Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/beta-catenin and Overexpress SOX2 and KLF4*. J Cell Physiol, 2016. **231**(4): p. 876-86.
241. Martins-Neves, S.R., et al., *Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 139.
242. Salerno, M., et al., *Sphere-forming cell subsets with cancer stem cell properties in human musculoskeletal sarcomas*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 95-102.
243. Wu, C., et al., *Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 8216-22.

244. Yang, M., et al., *Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(10): p. 1774-81.
245. Di Fiore, R., et al., *Modeling human osteosarcoma in mice through 3AB-OS cancer stem cell xenografts*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(11): p. 3380-92.
246. Di Fiore, R., et al., *Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment*. *J Cell Physiol*, 2009. **219**(2): p. 301-13.
247. Tang, Q.L., et al., *Enrichment of osteosarcoma stem cells by chemotherapy*. *Chin J Cancer*, 2011. **30**(6): p. 426-32.
248. Martins-Neves, S.R., et al., *Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling*. *Cancer Lett*, 2016. **370**(2): p. 286-95.
249. Yu, L., et al., *Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling*. *Oncotarget*, 2016. **7**(22): p. 33055-68.
250. Tsuchida, R., et al., *Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side-population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling*. *Oncogene*, 2008. **27**(28): p. 3923-34.
251. Li, Y., et al., *Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin-Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells*. *Stem Cell Reports*, 2017. **8**(6): p. 1617-1629.
252. Roundhill, E.A., S. Jabri, and S.A. Burchill, *ABCG1 and Pgp identify drug resistant, self-renewing osteosarcoma cells*. *Cancer Lett*, 2019. **453**: p. 142-157.
253. Wang, Y., et al., *Integrated analysis of transcriptome-wide m(6)A methylome of osteosarcoma stem cells enriched by chemotherapy*. *Epigenomics*, 2019. **11**(15): p. 1693-1715.
254. Greco, N., et al., *ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone*. *J Cancer Ther*, 2014. **5**(4): p. 331-338.
255. Rey, V., et al., *New Chondrosarcoma Cell Lines with Preserved Stem Cell Properties to Study the Genomic Drift During In Vitro/In Vivo Growth*. *J Clin Med*, 2019. **8**(4).
256. Wang, L., et al., *Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(2): p. 294-303.
257. Martinez-Cruzado, L., et al., *Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 27878-27878.
258. Martins-Neves, S.R., et al., *Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ $\beta$ -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4*. *J Cell Physiol*, 2016. **231**(4): p. 876-86.
259. Lohberger, B., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43664.
260. Rainusso, N., et al., *Identification and gene expression profiling of tumor-initiating cells isolated from human osteosarcoma cell lines in an orthotopic mouse model*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **12**(4): p. 278-87.
261. Tirino, V., et al., *Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3469.
262. Tirino, V., et al., *Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo*. *FASEB J*, 2011. **25**(6): p. 2022-30.
263. Fujiwara, T., et al., *Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells*. *Stem Cells*, 2014. **32**(4): p. 959-73.
264. He, A., et al., *CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study*. *Exp Ther Med*, 2012. **4**(3): p. 435-441.

265. Li, J., et al., *CD133 expression in osteosarcoma and derivation of CD133(+) cells*. Mol Med Rep, 2013. **7**(2): p. 577-84.
266. He, A., et al., *CD133(+) CD44(+) Cells Mediate in the Lung Metastasis of Osteosarcoma*. J Cell Biochem, 2015. **116**(8): p. 1719-29.
267. Sana, J., et al., *CD133 expression and identification of CD133/nestin positive cells in rhabdomyosarcomas and rhabdomyosarcoma cell lines*. Anal Cell Pathol (Amst), 2011. **34**(6): p. 303-18.
268. Veselska, R., et al., *Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 300.
269. Adhikari, A.S., et al., *CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4602-12.
270. Levings, P.P., et al., *Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5648-55.
271. Yu, L., et al., *Enrichment of human osteosarcoma stem cells based on hTERT transcriptional activity*. Oncotarget, 2013. **4**(12): p. 2326-38.
272. Zhang, W., et al., *mTORC1 maintains the tumorigenicity of SSEA-4(+) high-grade osteosarcoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9604.
273. Ying, M., et al., *Human osteosarcoma CD49f(-)CD133(+) cells: impaired in osteogenic fate while gain of tumorigenicity*. Oncogene, 2013. **32**(36): p. 4252-63.
274. Ehnman, M., et al., *The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis*. Current oncology reports, 2019. **21**(10): p. 90-90.
275. Pietrovito, L., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition*. Molecular oncology, 2018. **12**(5): p. 659-676.
276. Jolly, M.K., et al., *E-Cadherin Represses Anchorage-Independent Growth in Sarcomas through Both Signaling and Mechanical Mechanisms*. Mol Cancer Res, 2019. **17**(6): p. 1391-1402.
277. Schuetz, A.N., et al., *Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation*. Mod Pathol, 2005. **18**(11): p. 1403-10.
278. Masià, A., et al., *Notch-mediated induction of N-cadherin and  $\alpha$ 9-integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1374-83.
279. Kashima, T., et al., *Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo*. Int J Cancer, 2003. **104**(2): p. 147-54.
280. Hatano, M., et al., *Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone*. Clinical & Experimental Metastasis, 2015. **32**(6): p. 579-591.
281. Pinca, R.S., et al., *Targeting ROCK2 rather than ROCK1 inhibits Ewing sarcoma malignancy*. Oncol Rep, 2017. **37**(3): p. 1387-1393.
282. Wang, W., X. Zhou, and M. Wei, *MicroRNA-144 suppresses osteosarcoma growth and metastasis by targeting ROCK1 and ROCK2*. Oncotarget, 2015. **6**(12): p. 10297-10308.
283. Clark, A.G. and D.M. Vignjevic, *Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment*. Current Opinion in Cell Biology, 2015. **36**: p. 13-22.
284. Avnet, S., et al., *Pre-clinical Models for Studying the Interaction Between Mesenchymal Stromal Cells and Cancer Cells and the Induction of Stemness*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 305.
285. Alfranca, A., et al., *Bone microenvironment signals in osteosarcoma development*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(16): p. 3097-113.
286. Heymann, M.F., F. Lézot, and D. Heymann, *The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma*. Cell Immunol, 2019. **343**: p. 103711.

287. Crenn, V., et al., *Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: retrospective analysis and preclinical modeling*. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(11): p. 2333-2349.
288. Grünewald, T.G. and M. Alonso, *Sarcoma treatment in the era of molecular medicine*. 2020. **12**(11): p. e11131.
289. Avnet, S., et al., *Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance*. *Oncotarget*, 2016. **7**(39): p. 63408-63423.
290. Morozov, A., et al., *Benign mesenchymal stromal cells in human sarcomas*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2010. **16**(23): p. 5630-5640.
291. Chang, K.K., et al., *Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  and - $\beta$  promote cancer stem cell phenotypes in sarcomas*. *Oncogenesis*, 2018. **7**(6): p. 47.
292. Avnet, S., et al., *Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- $\kappa$ B activation*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(6): p. 1331-1345.
293. Baglio, S.R., et al., *Blocking Tumor-Educated MSC Paracrine Activity Halts Osteosarcoma Progression*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(14): p. 3721-3733.
294. Evdokimova, V., et al., *Exosomes transmit retroelement RNAs to drive inflammation and immunosuppression in Ewing Sarcoma*. *bioRxiv*, 2019: p. 806851.
295. Bonuccelli, G., et al., *Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells*. *Oncotarget*, 2014. **5**(17): p. 7575-88.
296. Grünewald, T.G.P., et al., *Ewing sarcoma*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018. **4**(1): p. 5.
297. Oda, Y., et al., *CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(5): p. 738-45.
298. Diomedei-Camassei, F., et al., *Clinical Significance of CXC Chemokine Receptor-4 and c-Met in Childhood Rhabdomyosarcoma*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008. **14**: p. 4119-27.
299. Lewis, D.M., et al., *Intratumoral oxygen gradients mediate sarcoma cell invasion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(33): p. 9292-7.
300. Libura, J., et al., *CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2597-606.
301. Tu, B., et al., *Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3*. *Oncotarget*, 2016. **7**(30): p. 48296-48308.
302. Han, X., et al., *Osteopontin as a biomarker for osteosarcoma therapy and prognosis*. *Oncology letters*, 2019. **17**(3): p. 2592-2598.
303. Huang, J.J. and G.C. Blobe, *Dichotomous roles of TGF- $\beta$  in human cancer*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(5): p. 1441-1454.
304. Zhang, H., et al., *Transforming growth factor  $\beta$ 1 signal is crucial for dedifferentiation of cancer cells to cancer stem cells in osteosarcoma*. *Stem Cells*, 2013. **31**(3): p. 433-46.
305. Katz, L.H., et al., *Targeting TGF- $\beta$  signaling in cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2013. **17**(7): p. 743-60.
306. Hou, C.H., R.S. Yang, and Y.T. Tsao, *Connective tissue growth factor stimulates osteosarcoma cell migration and induces osteosarcoma metastasis by upregulating VCAM-1 expression*. *Biochem Pharmacol*, 2018. **155**: p. 71-81.
307. Wang, L.H., et al., *CTGF promotes osteosarcoma angiogenesis by regulating miR-543/angiopoietin 2 signaling*. *Cancer Lett*, 2017. **391**: p. 28-37.



308. Tsai, H.C., et al., *CTGF increases matrix metalloproteinases expression and subsequently promotes tumor metastasis in human osteosarcoma through down-regulating miR-519d*. *Oncotarget*, 2014. **5**(11): p. 3800-12.
309. Liu, S.C., et al., *CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**(10): p. e1485.
310. Perut, F., et al., *Extracellular Nanovesicles Secreted by Human Osteosarcoma Cells Promote Angiogenesis*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(6).
311. Brenca, M., et al., *NR4A3 fusion proteins trigger an axon guidance switch that marks the difference between EWSR1 and TAF15 translocated extraskeletal myxoid chondrosarcomas*. *J Pathol*, 2019. **249**(1): p. 90-101.
312. Moriarity, B.S., et al., *A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis*. *Nat Genet*, 2015. **47**(6): p. 615-24.
313. Endo, Y., et al., *Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(7): p. 2368-79.
314. Kanojia, D., et al., *Genomic landscape of liposarcoma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(40): p. 42429-44.
315. Ghilardi, J.R., et al., *Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain*. *Molecular pain*, 2010. **6**: p. 87-87.
316. Nejman, D., et al., *The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria*. *Science*, 2020. **368**: p. 973-980.
317. WHO and B. Classification of Tumours Editorial, *Soft tissue and bone tumours*. 2020.
318. Biazzo, A. and M. De Paolis, *Multidisciplinary approach to osteosarcoma*. *Acta Orthop Belg*, 2016. **82**(4): p. 690-698.
319. Casali, P.G., et al., *Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv79-iv95.
320. Rubio, R., et al., *Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2014. **32**(5): p. 1136-48.
321. Rubio, R., et al., *The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development*. *Oncogene*, 2013. **32**(41): p. 4970-80.
322. Reimann, E., et al., *Whole exome sequencing of a single osteosarcoma case--integrative analysis with whole transcriptome RNA-seq data*. *Hum Genomics*, 2014. **8**(1): p. 20.
323. Berman, S.D., et al., *Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(33): p. 11851-6.
324. Calo, E., et al., *Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo*. *Nature*, 2010. **466**(7310): p. 1110-4.
325. Lin, P.P., et al., *Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(10): p. 1789-95.
326. Walkley, C.R., et al., *Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease*. *Genes Dev*, 2008. **22**(12): p. 1662-76.
327. Behjati, S., et al., *Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15936.
328. Kovac, M., et al., *Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8940.

329. Sayles, L.C., et al., *Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(1): p. 46-63.
330. Smida, J., et al., *Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma*. *Int J Cancer*, 2017. **141**(4): p. 816-828.
331. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 725-34.
332. Zhou, Y., et al., *Expression and therapeutic implications of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in osteosarcoma*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. **1864**(5 Pt A): p. 1573-1582.
333. Chan, L.H., et al., *Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression*. *Oncogene*, 2014. **33**(40): p. 4857-66.
334. Basu-Roy, U., et al., *Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6411.
335. Lockwood, W.W., et al., *Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma*. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 2011. **13**(3): p. 289-296.
336. Kuijjer, M.L., et al., *Identification of osteosarcoma driver genes by integrative analysis of copy number and gene expression data*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. **51**(7): p. 696-706.
337. Gambera, S. and A. Abarategi, *Role of Activator Protein-1 Complex on the Phenotype of Human Osteosarcomas Generated from Mesenchymal Stem Cells*. 2018. **36**(10): p. 1487-1500.
338. Entz-Werle, N., et al., *Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis*. *Neoplasia*, 2007. **9**(8): p. 678-88.
339. Chen, X., et al., *Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma*. *Cell Rep*, 2014. **7**(1): p. 104-12.
340. Lu, L., et al., *RECQ DNA helicases and osteosarcoma*. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **804**: p. 129-45.
341. Li, B., et al., *Epigenetic Regulation of CXCL12 Plays a Critical Role in Mediating Tumor Progression and the Immune Response In Osteosarcoma*. *Cancer Res*, 2018. **78**(14): p. 3938-3953.
342. Hogendoorn, P., J. Bovee, and G.P. Nielsen, *Chondrosarcoma (grades I-III), including primary and secondary variants and periosteal chondrosarcoma*. *World Health Classification of Tumours*, 2013: p. 264-268.
343. Wang, L., et al., *Identification of a novel, recurrent HEY1-NCOA2 fusion in mesenchymal chondrosarcoma based on a genome-wide screen of exon-level expression data*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. **51**(2): p. 127-39.
344. Amary, M.F., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours*. *J Pathol*, 2011. **224**(3): p. 334-43.
345. Tarpey, P.S., et al., *Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma*. *Nat Genet*, 2013. **45**(8): p. 923-6.
346. Zhang, Y.X., et al., *Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(14): p. 3796-807.
347. Schrage, Y.M., et al., *Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(9a): p. 2843-52.

348. Jin, Z., Y.X. Han, and X.R. Han, *Loss of RUNX3 expression may contribute to poor prognosis in patients with chondrosarcoma*. J Mol Histol, 2013. **44**(6): p. 645-52.
349. Sun, X., et al., *miR-181a Targets RGS16 to Promote Chondrosarcoma Growth, Angiogenesis, and Metastasis*. Mol Cancer Res, 2015. **13**(9): p. 1347-57.
350. Lai, T.H., et al., *Stromal cell-derived factor-1 increase alphavbeta3 integrin expression and invasion in human chondrosarcoma cells*. J Cell Physiol, 2009. **218**(2): p. 334-42.
351. Ginsberg, J.P., et al., *EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma*. J Clin Oncol, 1999. **17**(6): p. 1809-14.
352. Crompton, B.D., et al., *The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(11): p. 1326-41.
353. Cidre-Aranaz, F. and J. Alonso, *EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 162.
354. Boulay, G., et al., *Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain*. Cell, 2017. **171**(1): p. 163-178.e19.
355. Rocchi, A., et al., *CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**: p. 668-80.
356. Gorthi, A., et al., *EWS-FLI1 increases transcription to cause R-Loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma*. Nature, 2018. **555**.
357. Somasekharan, S.P., et al., *YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1*. J Cell Biol, 2015. **208**(7): p. 913-29.
358. Dei Tos, A.P., *Liposarcomas: diagnostic pitfalls and new insights*. Histopathology, 2014. **64**(1): p. 38-52.
359. Ferrari, A., et al., *Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **57**(6): p. 943-9.
360. Casali, P.G., et al., *Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv51-iv67.
361. Spiguel, A., *Soft tissue sarcomas*. Cancer Treat Res, 2014. **162**: p. 203-23.
362. Matushansky, I., et al., *A developmental model of sarcomagenesis defines a differentiation-based classification for liposarcomas*. Am J Pathol, 2008. **172**(4): p. 1069-80.
363. Yan, T., et al., *Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles*. J Cancer, 2014. **5**(7): p. 572-84.
364. DeVita, V.T., T.S. Lawrence, and S.A. Rosenberg, *Cancer: Principles & practice of oncology: Primer of the molecular biology of cancer*. 2015.
365. Crago, A.M., et al., *Copy number losses define subgroups of dedifferentiated liposarcoma with poor prognosis and genomic instability*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2012. **18**(5): p. 1334-1340.
366. Singer, S., et al., *Histologic Subtype and Margin of Resection Predict Pattern of Recurrence and Survival for Retroperitoneal Liposarcoma*. Annals of surgery, 2003. **238**: p. 358-70; discussion 370.
367. Hoang, N.T., et al., *A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 1089-1114.
368. Tap, W.D., et al., *Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(2): p. 95-112.

369. Chufal, S.S., et al., *Hypercellular round cell liposarcoma: A comprehensive cytomorphologic study and review of 8 cases*. Journal of cytology, 2017. **34**(2): p. 78-83.
370. Dalal, K.M., et al., *Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk*. Ann Surg, 2006. **244**(3): p. 381-91.
371. Lin, S., et al., *Metastasis of myxoid liposarcoma to fat-bearing areas: A case report of unusual metastatic sites and a hypothesis*. Oncology letters, 2015. **10**(4): p. 2543-2546.
372. Crago, A.M. and M.A. Dickson, *Liposarcoma: Multimodality Management and Future Targeted Therapies*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. **25**(4): p. 761-73.
373. Koelsche, C., et al., *TERT promoter hotspot mutations are recurrent in myxoid liposarcomas but rare in other soft tissue sarcoma entities*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**(1): p. 33.
374. Taylor, B.S., et al., *Functional copy-number alterations in cancer*. PloS one, 2008. **3**(9): p. e3179-e3179.
375. Funes, J.M., et al., *Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(15): p. 6223-6228.
376. Hofvander, J., et al., *Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 864-9.
377. Rubin, B.P., et al., *Evidence for an unanticipated relationship between undifferentiated pleomorphic sarcoma and embryonal rhabdomyosarcoma*. Cancer Cell, 2011. **19**(2): p. 177-91.
378. Ferrari, A., U. Dirksen, and S. Bielack, *Sarcomas of Soft Tissue and Bone*. Prog Tumor Res, 2016. **43**: p. 128-41.
379. Vlenterie, M., et al., *Outcome of chemotherapy in advanced synovial sarcoma patients: Review of 15 clinical trials from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; setting a new landmark for studies in this entity*. Eur J Cancer, 2016. **58**: p. 62-72.
380. Tamaki, S., et al., *SS18-SSX, the Oncogenic Fusion Protein in Synovial Sarcoma, Is a Cellular Context-Dependent Epigenetic Modifier*. PloS one, 2015. **10**(11): p. e0142991-e0142991.
381. Nielsen, T.O., N.M. Poulin, and M. Ladanyi, *Synovial sarcoma: recent discoveries as a roadmap to new avenues for therapy*. Cancer Discov, 2015. **5**(2): p. 124-34.
382. Lagarde, P., et al., *Chromosome instability accounts for reverse metastatic outcomes of pediatric and adult synovial sarcomas*. J Clin Oncol, 2013. **31**(5): p. 608-15.
383. Naka, N., et al., *Synovial Sarcoma Is a Stem Cell Malignancy*. STEM CELLS, 2010. **28**(7): p. 1119-1131.
384. Garcia, C.B., et al., *Reprogramming of mesenchymal stem cells by the synovial sarcoma-associated oncogene SYT-SSX2*. Oncogene, 2012. **31**(18): p. 2323-34.
385. Guo, X., et al., *Clinically Relevant Molecular Subtypes in Leiomyosarcoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(15): p. 3501-11.
386. Jagannathan, J.P., S.H. Tirumani, and N.H. Ramaiya, *Imaging in Soft Tissue Sarcomas: Current Updates*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. **25**(4): p. 645-75.
387. Lamm, W., et al., *Distinctive outcome in patients with non-uterine and uterine leiomyosarcoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 981.
388. Hernando, E., et al., *The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas*. Nature Medicine, 2007. **13**(6): p. 748-753.
389. Roncati, L., et al., *Loss of CDKN2A Promoter Methylation Coincides With the Epigenetic Transdifferentiation of Uterine Myosarcomatous Cells*. Int J Gynecol Pathol, 2016. **35**(4): p. 309-15.

390. Shern, J.F., M.E. Yohe, and J. Khan, *Pediatric Rhabdomyosarcoma*. Critical reviews in oncogenesis, 2015. **20**(3-4): p. 227-243.
391. Saab, R., S.L. Spunt, and S.X. Skapek, *Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle*. Curr Top Dev Biol, 2011. **94**: p. 197-234.
392. Huh, W.W. and S.X. Skapek, *Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment*. Curr Oncol Rep, 2010. **12**(6): p. 402-10.
393. Shern, J.F., et al., *Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors*. Cancer Discov, 2014. **4**(2): p. 216-31.
394. Olanich, M.E. and F.G. Barr, *A call to ARMS: targeting the PAX3-FOXO1 gene in alveolar rhabdomyosarcoma*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(5): p. 607-23.
395. Allison, D., et al., *A Meta-Analysis of Osteosarcoma Outcomes in the Modern Medical Era*. Sarcoma, 2012. **2012**: p. 704872.
396. Reed, D.R., et al., *Treatment pathway of bone sarcoma in children, adolescents, and young adults*. Cancer, 2017. **123**(12): p. 2206-2218.
397. Elkrif, A. and T. Alcindor, *Molecular targets and novel therapeutic avenues in soft-tissue sarcoma*. Current oncology (Toronto, Ont.), 2020. **27**(Suppl 1): p. 34-40.
398. Martinez-Cruzado, L., et al., *Trabectedin and Camptothecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2017. **19**(6): p. 460-470.
399. Young, R.J., et al., *Angiosarcoma*. Lancet Oncol, 2010. **11**(10): p. 983-91.
400. McGowan, J.V., et al., *Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity*. Cardiovascular drugs and therapy, 2017. **31**(1): p. 63-75.
401. Oun, R., Y.E. Moussa, and N.J. Wheate, *The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists*. Dalton Trans, 2018. **47**(19): p. 6645-6653.
402. Salgado, R., et al., *Steps forward for cancer precision medicine*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(1): p. 1-2.
403. Nakano, K. and S. Takahashi, *Precision Medicine in Soft Tissue Sarcoma Treatment*. Cancers, 2020. **12**(1): p. 221.
404. Gargallo, P., et al., *Precision medicine in Ewing sarcoma: a translational point of view*. Clinical and Translational Oncology, 2020. **22**.
405. Tirtei, E., et al., *Precision Medicine in Osteosarcoma: MATCH Trial and Beyond*. Cells, 2021. **10**(2): p. 281.
406. Italiano, A., et al., *Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): a prospective, multicentre, observational study*. Lancet Oncol, 2016. **17**(4): p. 532-538.
407. Martano, M., et al., *Photodynamic Surgery for Feline Injection-Site Sarcoma*. 2019. **2019**: p. 8275935.
408. Kusuzaki, K., et al., *Clinical Trial of Radiotherapy After Intravenous Injection of Acridine Orange for Patients with Cancer*. Anticancer Res, 2018. **38**(1): p. 481-489.
409. Pollack, S.M., et al., *Emerging Targeted and Immune-Based Therapies in Sarcoma*. J Clin Oncol, 2018. **36**(2): p. 125-135.
410. Orth, M.F., et al., *A comparative view on the expression patterns of PD-L1 and PD-1 in soft tissue sarcomas*. Cancer Immunol Immunother, 2020. **69**(7): p. 1353-1362.
411. Dancsok, A.R., et al., *Expression of lymphocyte immunoregulatory biomarkers in bone and soft-tissue sarcomas*. 2019. **32**(12): p. 1772-1785.
412. Thanindratarn, P., et al., *Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy*. J Bone Oncol, 2019. **15**: p. 100221.
413. Keung, E.Z., et al., *Correlative Analyses of the SARC028 Trial Reveal an Association Between Sarcoma-Associated Immune Infiltrate and Response to Pembrolizumab*. 2020. **26**(6): p. 1258-1266.

414. D'Angelo, S.P., et al., *Antitumor Activity Associated with Prolonged Persistence of Adoptively Transferred NY-ESO-1 (c259)T Cells in Synovial Sarcoma*. 2018. **8**(8): p. 944-957.
415. Majzner, R.G. and C.L. Mackall, *Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy*. 2018. **8**(10): p. 1219-1226.
416. Shi, J., M. Li, and R. Yang, *Tumor-infiltrating lymphocytes as a feasible adjuvant immunotherapy for osteosarcoma with a poor response to neoadjuvant chemotherapy*. *Immunotherapy*, 2020. **12**(9): p. 641-652.
417. Thiel, U., et al., *Allogeneic stem cell transplantation for patients with advanced rhabdomyosarcoma: a retrospective assessment*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(10): p. 2523-32.
418. Fernández, L., et al., *Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner*. *Cancer Lett*, 2015. **368**(1): p. 54-63.
419. Le Boeuf, F., et al., *Oncolytic Maraba Virus MG1 as a Treatment for Sarcoma*. *International Journal of Cancer*, 2017. **141**(6): p. 1257-1264.
420. Tazawa, H., et al., *Bone and Soft-Tissue Sarcoma: A New Target for Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy*. 2020. **12**(2).
421. Denton, N.L., et al., *Myelolytic Treatments Enhance Oncolytic Herpes Virotherapy in Models of Ewing Sarcoma by Modulating the Immune Microenvironment*. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2018. **11**: p. 62-74.
422. Martínez-Vélez, N., et al., *The Oncolytic Adenovirus VCN-01 as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma*. *Clinical Cancer Research*, 2016. **22**(9): p. 2217-2225.
423. Martínez-Vélez, N., et al., *The oncolytic adenovirus Δ24-RGD in combination with cisplatin exerts a potent anti-osteosarcoma activity*. *J Bone Miner Res*, 2014. **29**(10): p. 2287-96.
424. Lacroix, J. and Z. Kis, *Preclinical Testing of an Oncolytic Parvovirus in Ewing Sarcoma: Protoparvovirus H-1 Induces Apoptosis and Lytic Infection In Vitro but Fails to Improve Survival In Vivo*. 2018. **10**(6).
425. Streby, K.A., et al., *Intratumoral Injection of HSV1716, an Oncolytic Herpes Virus, Is Safe and Shows Evidence of Immune Response and Viral Replication in Young Cancer Patients*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(14): p. 3566-3574.
426. Kolb, E.A., et al., *A phase I trial and viral clearance study of reovirus (Reolysin) in children with relapsed or refractory extra-cranial solid tumors: a Children's Oncology Group Phase I Consortium report*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(5): p. 751-8.
427. Ramírez, M., et al., *Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology*. *Oncolytic virotherapy*, 2015. **4**: p. 149-155.
428. Morales-Molina, Á., et al., *Antitumor virotherapy using syngeneic or allogeneic mesenchymal stem cell carriers induces systemic immune response and intratumoral leukocyte infiltration in mice*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2018. **67**(10): p. 1589-1602.
429. Melen, G.J., et al., *Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells*. *Cancer Letters*, 2016. **371**(2): p. 161-170.
430. García-Castro, J., et al., *Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study*. *Cancer Gene Therapy*, 2010. **17**(7): p. 476-483.
431. Ruano, D., et al., *First-in-Human, First-in-Child Trial of Autologous MSCs Carrying the Oncolytic Virus Icovir-5 in Patients with Advanced Tumors*. *Mol Ther*, 2020. **28**(4): p. 1033-1042.

432. Morales-Molina, A., et al., *Combination immunotherapy using G-CSF and oncolytic virotherapy reduces tumor growth in osteosarcoma*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2021. **9**(3): p. e001703.
433. Petrov, I. and I. Gentshev, *Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (cAdMSCs) as a "Trojan Horse" in Vaccinia Virus Mediated Oncolytic Therapy against Canine Soft Tissue Sarcomas*. 2020. **12**(7).
434. Cejalvo, T., et al., *Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy*. Cancer Research, 2018. **78**(17): p. 4891.
435. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
436. Bhullar, K.S., et al., *Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions*. Molecular Cancer, 2018. **17**(1): p. 48.
437. Wheeler, D.L. and Y. Yarden, *Receptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions and Role in Human Disease*. 2015. 1-440.
438. Davis, L.E., et al., *Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma*. J Clin Oncol, 2019. **37**(16): p. 1424-1431.
439. Collett, M.S. and R.L. Erikson, *Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 2021-4.
440. Ward, N.E. and C.A. O'Brian, *Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates*. Mol Pharmacol, 1992. **41**(2): p. 387-92.
441. Capdeville, R., et al., *Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(7): p. 493-502.
442. Motyckova, G. and R. Stone, *Development of Midostaurin as a Tyrosine Kinase Inhibitor*. 2015: p. 201-214.
443. Stone, R.M., et al., *Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(5): p. 454-464.
444. Shukla, S., et al., *Elucidation of the structural basis of interaction of the BCR-ABL kinase inhibitor, nilotinib (Tasigna) with the human ABC drug transporter P-glycoprotein*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 961-4.
445. Jonker, D.J., et al., *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(20): p. 2040-2048.
446. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
447. Kittler, H. and P. Tschandl, *Driver mutations in the mitogen-activated protein kinase pathway: the seeds of good and evil*. Br J Dermatol, 2018. **178**(1): p. 26-27.
448. Yadav, V., et al., *Co-targeting BRAF and cyclin dependent kinases 4/6 for BRAF mutant cancers*. Pharmacol Ther, 2015. **149**: p. 139-49.
449. Liu, Q., et al., *Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52175-82.
450. Sun, C., et al., *Aurora kinase inhibition downregulates NF-kappaB and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(1): p. 220-5.
451. Wilson, T.R., et al., *Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 505-509.
452. Lito, P., N. Rosen, and D.B. Solit, *Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors*. Nature Medicine, 2013. **19**(11): p. 1401-1409.
453. Chell, V., et al., *Tumour cell responses to new fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and identification of a gatekeeper mutation in FGFR3 as a mechanism of acquired resistance*. Oncogene, 2013. **32**(25): p. 3059-70.

454. Kannaiyan, R. and D. Mahadevan, *A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2018. **18**(12): p. 1249-1270.
455. Shah, D.R., R.R. Shah, and J. Morganroth, *Tyrosine kinase inhibitors: their on-target toxicities as potential indicators of efficacy*. Drug Saf, 2013. **36**(6): p. 413-26.
456. Garuti, L., M. Roberti, and G. Bottegoni, *Multi-kinase inhibitors*. Curr Med Chem, 2015. **22**(6): p. 695-712.
457. Longo, D.L., *Imatinib changed everything*. 2017, Mass Medical Soc.
458. Abdelgalil, A.A., H.M. Alkahtani, and F.I. Al-Jenoobi, *Sorafenib*, in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2019, Elsevier. p. 239-266.
459. Lacy, S.A., D.R. Miles, and L.T. Nguyen, *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cabozantinib*. Clinical pharmacokinetics, 2017. **56**(5): p. 477-491.
460. Ettrich, T.J. and T. Seufferlein, *Regorafenib*. Small Molecules in Oncology, 2018: p. 45-56.
461. Sánchez, C., et al., *Generation of potent and selective kinase inhibitors by combinatorial biosynthesis of glycosylated indolocarbazoles*. Chemical Communications, 2009(27): p. 4118-4120.
462. Cuenca-Lopez, M.D., et al., *Antitumor activity of the novel multi-kinase inhibitor EC-70124 in triple negative breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(29): p. 27923-37.
463. Serrano-Heras, G., et al., *Phospho-kinase profile of colorectal tumors guides in the selection of multi-kinase inhibitors*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31272-31283.
464. Ocana, A., et al., *1600P - Phospho-Kinase Expression and Anti-Tumoral Activity of the Novel Multikinase Inhibitor Ec-70124 in Colon Cancer*. Annals of Oncology, 2014. **25**: p. iv555.
465. Civenni, G., et al., *EC-70124, a Novel Glycosylated Indolocarbazole Multikinase Inhibitor, Reverts Tumorigenic and Stem Cell Properties in Prostate Cancer by Inhibiting STAT3 and NF- $\kappa$ B*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(5): p. 806-18.
466. García-Inclán, C., et al., *36 A new anticancer drug in sinonasal carcinoma targeting the NF $\kappa$ B pathway*. Oral Oncology, 2015. **51**(5): p. e38.
467. Nogueira, L., et al., *The NF $\kappa$ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma*. Oncotarget, 2011. **2**(8): p. 646-653.
468. Puente-Moncada, N., et al., *Inhibition of FLT3 and PIM Kinases by EC-70124 Exerts Potent Activity in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia*. Mol Cancer Ther, 2018. **17**(3): p. 614-624.
469. Kumari, P., B. Ghosh, and S. Biswas, *Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery*. J Drug Target, 2016. **24**(3): p. 179-91.
470. Gilabert-Oriol, R., et al., *Liposomal Formulations to Modulate the Tumour Microenvironment and Antitumour Immune Response*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
471. Gonda, A., et al., *Engineering Tumor-Targeting Nanoparticles as Vehicles for Precision Nanomedicine*. Med One, 2019. **4**.
472. Tsoi, K.M., et al., *Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver*. Nature Materials, 2016. **15**(11): p. 1212-1221.
473. Feynman, R.P.J.C.I.o.T., Engineering and S. magazine, *There's plenty of room at the bottom*. 1960.
474. Chen, F., et al., *New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities*. BMC Medicine, 2015. **13**(1): p. 45.
475. Awasthi, R., et al., *Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles*. Curr Drug Targets, 2018. **19**(14): p. 1696-1709.
476. Wu, L., J. Zhang, and W. Watanabe, *Physical and chemical stability of drug nanoparticles*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(6): p. 456-69.
477. García-Manrique, P., et al., *Using Factorial Experimental Design To Prepare Size-Tuned Nanovesicles*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2016. **55**(34): p. 9164-9175.



478. Adebowale, A.S., et al., *Functionalized Nanocarriers for Enhanced Bioactive Delivery to Squamous Cell Carcinomas: Targeting Approaches and Related Biopharmaceutical Aspects*. *Curr Pharm Des*, 2015. **21**(22): p. 3167-80.
479. Cabral, H., et al., *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*. *Nature Nanotechnology*, 2011. **6**(12): p. 815-823.
480. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(9): p. 941-51.
481. Danaei, M., et al., *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(2).
482. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?* *Journal of Controlled Release*, 2016. **235**: p. 337-351.
483. Asghari, F., et al., *Application of Nanotechnology in Targeting of Cancer Stem Cells: A Review*. *International journal of stem cells*, 2019. **12**(2): p. 227-239.
484. Zielińska, A., et al., *Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology*. 2020. **25**(16).
485. Anselmo, A.C., et al., *Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting*. *ACS Nano*, 2015. **9**(3): p. 3169-3177.
486. Gentile, F., et al., *The effect of shape on the margination dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows*. *J Biomech*, 2008. **41**(10): p. 2312-8.
487. Najafi-Hajivar, S., et al., *Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **83**: p. 1365-1378.
488. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer Res*, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
489. Golombek, S.K., et al., *Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018. **130**: p. 17-38.
490. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. *The American journal of pathology*, 2000. **156**(4): p. 1363-1380.
491. Nagy, J.A., et al., *Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?* *Br J Cancer*, 2009. **100**(6): p. 865-9.
492. Dudley, A.C., *Tumor endothelial cells*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(3): p. a006536.
493. Hori, K., et al., *Tumor-selective blood flow decrease induced by an angiotensin converting enzyme inhibitor, temocapril hydrochloride*. *Jpn J Cancer Res*, 2000. **91**(2): p. 261-9.
494. Ashfaq, U.A., et al., *Recent Advances in Nanoparticle-Based Targeted Drug-Delivery Systems Against Cancer and Role of Tumor Microenvironment*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2017. **34**(4): p. 317-353.
495. Alavi, M. and M. Hamidi, *Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles*. *Drug Metab Pers Ther*, 2019. **34**(1).
496. Huang, W.F., et al., *Optimization strategy for encapsulation efficiency and size of drug loaded silica xerogel/polymer core-shell composite nanoparticles prepared by gelation-emulsion method*. *Polymer Engineering & Science*, 2018. **58**(5): p. 742-751.
497. Yokoi, K., et al., *Capillary-wall collagen as a biophysical marker of nanotherapeutic permeability into the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2014. **74**(16): p. 4239-46.
498. Luo, Z., Y. Dai, and H. Gao, *Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019. **9**(6): p. 1099-1112.
499. Arabi, L., et al., *Targeting CD44 expressing cancer cells with anti-CD44 monoclonal antibody improves cellular uptake and antitumor efficacy of liposomal doxorubicin*. *J Control Release*, 2015. **220**(Pt A): p. 275-286.

500. Gener, P., et al., *Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(8): p. 1883-92.
501. Seok, H.-Y., et al., *CD44 targeting biocompatible and biodegradable hyaluronic acid cross-linked zein nanogels for curcumin delivery to cancer cells: In vitro and in vivo evaluation*. *Journal of Controlled Release*, 2018. **280**: p. 20-30.
502. Ni, M., et al., *Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells*. *Int J Nanomedicine*, 2015. **10**: p. 2537-54.
503. Ross, M.H., et al., *Bone-Induced Expression of Integrin  $\beta 3$  Enables Targeted Nanotherapy of Breast Cancer Metastases*. *Cancer Res*, 2017. **77**(22): p. 6299-6312.
504. Guo, P., et al., *Nanoparticle elasticity directs tumor uptake*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 130.
505. Wadhwa, S., et al., *Nanovesicles for Nanomedicine: Theory and Practices*. *Methods Mol Biol*, 2019. **2000**: p. 1-17.
506. El-Hammadi, M.M. and J.L. Arias, *An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014-2018)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2019. **29**(11): p. 891-907.
507. Briuglia, M.L., et al., *Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release*. *Drug Deliv Transl Res*, 2015. **5**(3): p. 231-42.
508. Porche, D.J., *Liposomal doxorubicin (Doxil)*. *J Assoc Nurses AIDS Care*, 1996. **7**(2): p. 55-9.
509. Judson, I., et al., *Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL®/CAELYX®) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group*. *European Journal of Cancer*, 2001. **37**(7): p. 870-877.
510. *Kaposi's sarcoma: DaunoXome approved*. *AIDS Treat News*, 1996(no 246): p. 3-4.
511. Anderson, P.M., et al., *Mifamurtide in metastatic and recurrent osteosarcoma: a patient access study with pharmacokinetic, pharmacodynamic, and safety assessments*. *Pediatric blood & cancer*, 2014. **61**(2): p. 238-244.
512. Rai, S., V. Pandey, and G. Rai, *Transfersomes as versatile and flexible nano-vesicular carriers in skin cancer therapy: the state of the art*. *Nano reviews & experiments*, 2017. **8**(1): p. 1325708-1325708.
513. Qiu, L., N. Jing, and y. jin, *Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method*. *International journal of pharmaceutics*, 2008. **361**: p. 56-63.
514. Liu, C., Q. Feng, and J. Sun, *Lipid nanovesicles by microfluidics: manipulation, synthesis, and drug delivery*. *Advanced Materials*, 2019. **31**(45): p. 1804788.
515. Laouini, A., et al., *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 2012. **1**: p. 147-168.
516. Verma, P. and K. Pathak, *Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(4): p. 489-96.
517. El-Say, K.M. and H.S. El-Sawy, *Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery*. *Int J Pharm*, 2017. **528**(1-2): p. 675-691.
518. Ahlawat, J., G. Henriquez, and M. Narayan, *Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles*. *Molecules*, 2018. **23**(9).
519. Rezvantalab, S., et al., *PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment*. *Frontiers in pharmacology*, 2018. **9**: p. 1260-1260.
520. Crook, J.M., et al., *Intermittent androgen suppression in the management of prostate cancer*. *Urology*, 1999. **53**(3): p. 530-534.

521. Mallery, S.R., et al., *Controlled-release of doxorubicin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres significantly enhances cytotoxicity against cultured AIDS-related Kaposi's sarcoma cells*. *Anticancer research*, 2000. **20**(5A): p. 2817-2825.
522. Tang, Y., et al., *Simultaneous Delivery of Chemotherapeutic and Thermal-Optical Agents to Cancer Cells by a Polymeric (PLGA) Nanocarrier: An In Vitro Study*. *Pharmaceutical Research*, 2010. **27**(10): p. 2242-2253.
523. Gao, L., et al., *The improved antitumor efficacy of continuous intratumoral chemotherapy with cisplatin-loaded implants for the treatment of sarcoma 180 tumor-bearing mice*. *Drug delivery*, 2019. **26**(1): p. 208-215.
524. Yu, L., et al., *The thermogelling PLGA-PEG-PLGA block copolymer as a sustained release matrix of doxorubicin*. *Biomaterials Science*, 2013. **1**(4): p. 411-420.
525. Dave, V., et al., *Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Development & statistical optimization of norfloxacin for topical drug delivery system*. *Bioactive Materials*, 2017. **2**(4): p. 269-280.
526. Blasi, P., *Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview*. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2019. **49**(4): p. 337-346.
527. Zhang, L., et al., *Dual drug-loaded PLA nanoparticles bypassing drug resistance for improved leukemia therapy*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2019. **21**(4): p. 1-13.
528. Zheng, W., et al., *Encapsulation of verapamil and doxorubicin by MPEG-PLA to reverse drug resistance in ovarian cancer*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. **108**: p. 565-573.
529. Mineo, P.G., et al., *Salinomycin-loaded PLA nanoparticles: drug quantification by GPC and wave voltammetry and biological studies on osteosarcoma cancer stem cells*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020. **412**: p. 4681-4690.
530. Li, J. and D.J. Mooney, *Designing hydrogels for controlled drug delivery*. *Nature Reviews Materials*, 2016. **1**(12): p. 16071.
531. Sun, Z., et al., *Hydrogel-Based Controlled Drug Delivery for Cancer Treatment: A Review*. *Molecular Pharmaceutics*, 2020. **17**(2): p. 373-391.
532. Rodríguez-Llansola, F., et al., *Selective and highly efficient dye scavenging by a pH-responsive molecular hydrogelator*. *Chemical Communications*, 2010. **46**(42): p. 7960-7962.
533. Torchilin, V.P., *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014. **13**(11): p. 813-827.
534. Fan, D.-Y., Y. Tian, and Z.-J. Liu, *Injectable Hydrogels for Localized Cancer Therapy*. *Frontiers in chemistry*, 2019. **7**: p. 675-675.
535. Chen, C.H., et al., *Thermosensitive Injectable Hydrogel for Simultaneous Intraperitoneal Delivery of Doxorubicin and Prevention of Peritoneal Adhesion*. 2018. **19**(5).
536. Ma, H., et al., *PLK1shRNA and doxorubicin co-loaded thermosensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogels for osteosarcoma treatment*. *Biomaterials*, 2014. **35**(30): p. 8723-8734.
537. Lin, Z., et al., *A comparative investigation between paclitaxel nanoparticle- and nanocrystal-loaded thermosensitive PECT hydrogels for peri-tumoural administration*. *Nanoscale*, 2016. **8**(44): p. 18782-18791.
538. Liu, H., et al., *Injectable, Biodegradable, Thermosensitive Nanoparticles-Aggregated Hydrogel with Tumor-Specific Targeting, Penetration, and Release for Efficient Postsurgical Prevention of Tumor Recurrence*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019. **11**(22): p. 19700-19711.
539. Qu, J., et al., *pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy*. *Acta Biomater*, 2017. **58**: p. 168-180.
540. Fathi, M., et al., *Dual thermo-and pH-sensitive injectable hydrogels of chitosan/(poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid)) for doxorubicin delivery in breast cancer*. *Int J Biol Macromol*, 2019. **128**: p. 957-964.

541. Ruan, C., et al., *NIR-II light-modulated thermosensitive hydrogel for light-triggered cisplatin release and repeatable chemo-photothermal therapy*. *Chemical Science*, 2019. **10**(17): p. 4699-4706.
542. Mejia Oneto, J.M., et al., *In Vivo Bioorthogonal Chemistry Enables Local Hydrogel and Systemic Pro-Drug To Treat Soft Tissue Sarcoma*. *ACS Central Science*, 2016. **2**(7): p. 476-482.
543. Lombó, F., et al., *The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006. **73**: p. 1-14.
544. Kormanec, J., et al., *The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020. **104**(18): p. 7701-7721.
545. Weidenbach, S., et al., *Dimerization and DNA recognition rules of mithramycin and its analogues*. *J Inorg Biochem*, 2016. **156**: p. 40-7.
546. Blume, S.W., et al., *Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(5): p. 1613-21.
547. Vizcaíno, C., S. Mansilla, and J. Portugal, *Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015. **152**: p. 111-124.
548. Kennedy, B.J., *Metabolic and toxic effects of mithramycin during tumor therapy*. *Am J Med*, 1970. **49**(4): p. 494-503.
549. Sissung, T.M., et al., *Severe Hepatotoxicity of Mithramycin Therapy Caused by Altered Expression of Hepatocellular Bile Transporters*. *Mol Pharmacol*, 2019. **96**(2): p. 158-167.
550. Quarni, W., et al., *Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 15202.
551. Liu, R., et al., *Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Krüppel-like factor 5 transcription by Sp1*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 1138.
552. Saha, S., et al., *Mithramycin A sensitizes therapy-resistant breast cancer stem cells toward genotoxic drug doxorubicin*. *Transl Res*, 2015. **165**(5): p. 558-77.
553. Wang, S., et al., *Mithramycin suppresses DNA damage repair via targeting androgen receptor in prostate cancer*. *Cancer Letters*, 2020. **488**: p. 40-49.
554. Liu, X.J., et al., *Mithramycin-loaded mPEG-PLGA nanoparticles exert potent antitumor efficacy against pancreatic carcinoma*. *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**: p. 5255-5269.
555. Singh, D.K., et al., *Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma*. *Cell Rep*, 2017. **18**(4): p. 961-976.
556. Wang, S., et al., *Sp1 promotes ovarian cancer cell migration through repressing miR-335 expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **524**(1): p. 211-216.
557. Grohar, P., et al., *A phase I/II trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS–FLI1 fusion transcript*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2017. **80**.
558. Flores, G., et al., *CDK9 Blockade Exploits Context-dependent Transcriptional Changes to Improve Activity and Limit Toxicity of Mithramycin for Ewing Sarcoma*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2020. **19**(5): p. 1183.
559. Lin, M.Y., et al., *Mithramycin A Radiosensitizes EWS:Fli1+ Ewing Sarcoma Cells by Inhibiting Double Strand Break Repair*. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 2020.
560. Fernández-Guizán, A., et al., *The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription*. *Chem Biol Interact*, 2014. **219**: p. 123-32.

561. Núñez, L.E., et al., *A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis*. J Med Chem, 2012. **55**(12): p. 5813-25.
562. Osgood, C.L., et al., *Identification of Mithramycin Analogues with Improved Targeting of the EWS-FLI1 Transcription Factor*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2016. **22**(16): p. 4105-4118.
563. Fernández-Guizán, A., et al., *Pleiotropic Anti-Angiogenic and Anti-Oncogenic Activities of the Novel Mithralog Demycarosyl-3D-β-D-Digitoxosyl-Mithramycin SK (EC-8042)*. PLOS ONE, 2015. **10**(11): p. e0140786.
564. Federico, A., et al., *Mithramycin A and Mithralog EC-8042 Inhibit SETDB1 Expression and Its Oncogenic Activity in Malignant Melanoma*. Molecular Therapy - Oncolytics, 2020. **18**: p. 83-99.
565. Pandiella, A., et al., *Antitumoral activity of the mithralog EC-8042 in triple negative breast cancer linked to cell cycle arrest in G2*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 32856-32867.
566. Hermida-Prado, F., et al., *The SRC Inhibitor Dasatinib Induces Stem Cell-Like Properties in Head and Neck Cancer Cells that are Effectively Counteracted by the Mithralog EC-8042*. Journal of Clinical Medicine, 2019. **8**(8).
567. Shinde, D., et al., *Transcriptional Reprogramming and Inhibition of Tumor-propagating Stem-like Cells by EC-8042 in ERG-positive Prostate Cancer*. European Urology Oncology, 2019. **2**(4): p. 415-424.
568. Schweer, D., et al., *Mithramycin and Analogs for Overcoming Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer*. Biomedicines, 2021. **9**(1): p. 70.
569. Tornin, J., et al., *Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma*. Oncotarget, 2016. **7**(21): p. 30935-30950.
570. Otero, A., et al., *Chiral N,N,O-Scorpionate Zinc Alkyls as Effective and Stereoselective Initiators for the Living ROP of Lactides*. Organometallics, 2012. **31**(11): p. 4191-4202.
571. Funes, J.M., et al., *Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6223-8.
572. Rodriguez, R., et al., *Human bone marrow stromal cells lose immunosuppressive and anti-inflammatory properties upon oncogenic transformation*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(4): p. 606-19.
573. Martinez-Cruzado, L., et al., *Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27878.
574. Rey, V., et al., *New Chondrosarcoma Cell Lines with Preserved Stem Cell Properties to Study the Genomic Drift During In Vitro/In Vivo Growth*. Journal of clinical medicine, 2019. **8**(4): p. 455.
575. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 621-81.
576. Estupiñan, O., et al., *The multikinase inhibitor EC-70124 synergistically increased the antitumor activity of doxorubicin in sarcomas*. International Journal of Cancer, 2019. **145**(1): p. 254-266.
577. Estupiñán, Ó., et al., *Nano-Encapsulation of Mithramycin in Transfersomes and Polymeric Micelles for the Treatment of Sarcomas*. 2021. **10**(7).
578. Estupiñán, Ó., et al., *Mithramycin delivery systems to develop effective therapies in sarcomas*. Journal of Nanobiotechnology, 2021. **19**(1): p. 267.
579. Tang, B., et al., *A Flexible Reporter System for Direct Observation and Isolation of Cancer Stem Cells*. Stem Cell Reports, 2015. **4**(1): p. 155-169.

580. Menendez, S.T., et al., *SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications*. *Cancers* (Basel), 2020. **12**(4).
581. Martinez-Cruzado, L., et al., *Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 27878.
582. Harwood, J.L., et al., *Targeted Chemotherapy in Bone and Soft-Tissue Sarcoma*. *Orthop Clin North Am*, 2015. **46**(4): p. 587-608.
583. Chadalapaka, G., et al., *Inhibition of rhabdomyosarcoma cell and tumor growth by targeting specificity protein (Sp) transcription factors*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(4): p. 795-806.
584. Lou, Z., et al., *Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation*. *Cancer Res*, 2005. **65**(3): p. 1007-17.
585. Meng, Y., et al., *Positive feedback loop SP1/MIR17HG/miR-130a-3p promotes osteosarcoma proliferation and cisplatin resistance*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020. **521**(3): p. 739-745.
586. Poveda, A., et al., *Phase II Clinical Trial With Pegylated Liposomal Doxorubicin (CAELYX®/Doxil®) and Quality of Life Evaluation (EORTC QLQ-C30) in Adult Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: A study of the Spanish Group for Research in Sarcomas (GEIS)*. *Sarcoma*, 2005. **9**: p. 257250.
587. Savani, M., P. Murugan, and K.M. Skubitz, *Long-term cure of soft tissue sarcoma with pegylated-liposomal doxorubicin after doxorubicin and ifosfamide failure*. *Clinical Sarcoma Research*, 2019. **9**(1): p. 1.
588. Wibroe, P.P., et al., *An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome*. *J Control Release*, 2016. **221**: p. 1-8.
589. Zheng, H., et al., *Exhausting tumor associated macrophages with sialic acid-polyethyleneimine-cholesterol modified liposomal doxorubicin for enhancing sarcoma chemotherapy*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019. **558**: p. 187-200.
590. Riganti, C., et al., *Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells*. *Mol Pharm*, 2011. **8**(3): p. 683-700.
591. Mukthavaram, R., et al., *High-efficiency liposomal encapsulation of a tyrosine kinase inhibitor leads to improved in vivo toxicity and tumor response profile*. *International journal of nanomedicine*, 2013. **8**: p. 3991-4006.
592. Ashton, S., et al., *Aurora kinase inhibitor nanoparticles target tumors with favorable therapeutic index in vivo*. *Science Translational Medicine*, 2016. **8**(325): p. 325ra17-325ra17.
593. Shukla, S.K., et al., *Sorafenib Loaded Inhalable Polymeric Nanocarriers against Non-Small Cell Lung Cancer*. *Pharmaceutical Research*, 2020. **37**(3): p. 67.
594. Madamsetty, V.S., et al., *Design and Evaluation of PEGylated Liposomal Formulation of a Novel Multikinase Inhibitor for Enhanced Chemosensitivity and Inhibition of Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Bioconjugate Chemistry*, 2019. **30**(10): p. 2703-2713.
595. Spring, B.Q., et al., *A photoactivable multi-inhibitor nanoliposome for tumour control and simultaneous inhibition of treatment escape pathways*. *Nature Nanotechnology*, 2016. **11**(4): p. 378-387.
596. Gao, M., Y. Xu, and L. Qiu, *Sensitization of multidrug-resistant malignant cells by liposomes co-encapsulating doxorubicin and chloroquine through autophagic inhibition*. *Journal of Liposome Research*, 2017. **27**(2): p. 151-160.
597. Pan, Y., et al., *Novel dendritic polyglycerol-conjugated, mesoporous silica-based targeting nanocarriers for co-delivery of doxorubicin and tariquidar to overcome multidrug*

- resistance in breast cancer stem cells*. Journal of Controlled Release, 2021. **330**: p. 1106-1117.
598. Singh, S., *Liposome encapsulation of doxorubicin and celecoxib in combination inhibits progression of human skin cancer cells*. International journal of nanomedicine, 2018. **13**(T-NANO 2014 Abstracts): p. 11-13.
599. Yahuafai, J., et al., *Anticancer Efficacy of the Combination of Berberine and PEGylated Liposomal Doxorubicin in Meth A Sarcoma-Bearing Mice*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2018. **41**(7): p. 1103-1106.
600. Debele, T.A., et al., *pH- and GSH-Sensitive Hyaluronic Acid-MP Conjugate Micelles for Intracellular Delivery of Doxorubicin to Colon Cancer Cells and Cancer Stem Cells*. 2018. **19**(9): p. 3725-3737.
601. Kim, D.-M., et al., *Anti-MUC1/CD44 Dual-Aptamer-Conjugated Liposomes for Cotargeting Breast Cancer Cells and Cancer Stem Cells*. ACS Applied Bio Materials, 2019. **2**(10): p. 4622-4633.
602. Kesharwani, P., et al., *Hyaluronic Acid Engineered Nanomicelles Loaded with 3,4-Difluorobenzylidene Curcumin for Targeted Killing of CD44+ Stem-Like Pancreatic Cancer Cells*. Biomacromolecules, 2015. **16**(9): p. 3042-3053.
603. Valcourt, D.M. and E.S. Day, *Dual Regulation of miR-34a and Notch Signaling in Triple-Negative Breast Cancer by Antibody/miRNA Nanocarriers*. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2020. **21**: p. 290-298.
604. Valcourt, D.M., et al., *Nanoparticle-Mediated Co-Delivery of Notch-1 Antibodies and ABT-737 as a Potent Treatment Strategy for Triple-Negative Breast Cancer*. ACS Nano, 2020. **14**(3): p. 3378-3388.
605. Dai, G., et al., *Inhibition of the Notch signaling pathway attenuates progression of cell motility, metastasis, and epithelial-to-mesenchymal transition-like phenomena induced by low concentrations of cisplatin in osteosarcoma*. Eur J Pharmacol, 2021. **899**: p. 174058.