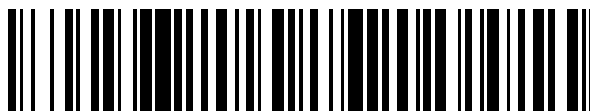


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 072**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012** **PCT/EP2012/057049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12143377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012** **E 12717643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2699319**

54 Título: **Niclosamida para el tratamiento de la metástasis en el cáncer**

30 Prioridad:

**18.04.2011 EP 11162875**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.12.2017**

73 Titular/es:

**MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE  
MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT  
(100.0%)  
Robert-Rössle-Strasse 10  
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**STEIN, ULRIKE;  
WALTHER, WOLFGANG;  
SACK, ULRIKE;  
SHOEMAKER, ROBERT;  
SCUDIERO, DOMINIC y  
SCHLAG, PETER M.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 647 072 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Niclosamida para el tratamiento de la metástasis en el cáncer

## 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La metástasis del cáncer se asocia a menudo con la activación de la vía de señalización de Wnt/beta-catenina y la elevada expresión del gen inductor de la metástasis S100A4. Se ha demostrado recientemente, que el S100A4 está regulado transcripcionalmente por beta-catenina y que es importante para el cáncer de colón y metástasis. La invención se refiere a la niclosamida y sus derivados, que inhibe eficazmente la transcripción del gen S100A4, que tiene como resultado la inhibición de la movilidad celular, invasión, metástasis y proliferación de células cancerosas humanas inducidas por S100A4.

## Antecedentes de la invención

15 Durante las últimas décadas, la eficacia del tratamiento del cáncer ha mejorado considerablemente. Sin embargo, los parámetros de resultados clínicos en particular la situación metafísica, sólo han cambiado moderadamente. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos enfoques para luchar contra el cáncer es el mayor objetivo de los científicos así como de las compañías farmacéuticas.

20 El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más frecuente con una incidencia al alza en los países occidentales. En Estados Unidos, esta enfermedad representa el 10% de todos los cánceres, y actualmente es la segunda o tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en hombres o mujeres, respectivamente (10% ambos sexos combinados). En Europa, en el año 2004, el cáncer colorrectal era el segundo cáncer más común tanto en términos de incidencia (376400 casos,13%) como mortalidad (203 700 muertes,12%). En Alemania, el cáncer colorrectal también se encontraba entre las 20 causas más frecuentes de muerte relacionada con el cáncer en el año 2003, con un 18% en hombres después del cáncer de pulmón y con 11% en mujeres, después del cáncer de mama y de pulmón. El año 2007, más de 70 000 personas sufrieron cáncer colorrectal en Alemania y 30 000 fallecieron a causa de esta enfermedad (<http://www.aerztezeitung.de>). Se calculó, que aproximadamente el 6% de la población alemana, que es igual a aproximadamente 5 millones de personas, padecerán cáncer colorrectal en el transcurso de su vida. Por consiguiente, son extremadamente deseables unos esfuerzos crecientes para el entendimiento, la prevención y la intervención acerca esta enfermedad.

Actualmente, el cáncer colorrectal y su metástasis se entienden como el resultado de cambios tempranos durante la progresión tumoral que determinan la capacidad metastásica. Las anomalías genéticas que ocurren durante la transformación neoplásica son esenciales para que el cáncer surja y la mayoría de las anomalías tienen lugar en etapas tempranas del proceso de la enfermedad pero ninguna de las anomalías es conocida por estar especialmente asociada con la metástasis. El «cambio de estado» (=metástasis), cuando el cáncer se disemina de sus sitios primarios a los sitios secundarios en el cuerpo es uno de los hitos del cáncer. La diseminación y el crecimiento de lesiones satélite en otros órganos es responsable de más del 90% de las muertes por neoplasia. Los tumores primarios se pueden extraer por cirugía pero las lesiones ampliamente metastásicas son difíciles de detectar y resulta difícil o imposible tratarlas con tratamientos adyuvantes. La metástasis es un proceso multi-etapa, que implica la pérdida de la adhesión celular, una motilidad aumentada de las células, la invasión de tejido circundante, intravasación de los vasos sanguíneos o el sistema linfático que entra en el sistema circulatorio, extravasación desde el sistema circulatorio, proliferación en un nuevo sitio secundario, y construcción de un sistema vascular para dar apoyo al crecimiento. La capacidad de un tumor para facilitar la metástasis se adquiere a través de los cambios en la expresión de los genes y del entorno.

Se tiene un amplio conocimiento acerca de las moléculas que contribuyen al fenotipo metastásico, acerca de las vías que controlan y acerca de los genes que regulan. El estadiaje molecular es un prerequisite importante para mejorar el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento puesto que actualmente la prognosis del paciente todavía se define principalmente por el estadiaje histopatológico, una descripción estadística de la extensión anatómica de la diseminación del tumor en una muestra quirúrgica. Los determinantes moleculares de la progresión y metástasis del cáncer colorrectal representan tanto los marcadores de pronóstico de la metástasis como las dianas para las estrategias de intervención que se centran en el objetivo principal de la prevención de la metástasis.

El cáncer colorrectal se asocia a menudo con la activación de la vía de señalización de Wnt/beta-catenina y la elevada expresión del gen inductor de la metástasis S100A4. Además de su función en la adhesión célula-célula, la beta-catenina es también un mediador importante en la vía de señalización Wnt canónica. Cuando no hay

- señalización Wnt, dos proteínas adaptadoras, el supresor de tumores APC y AXIN forman el denominado complejo de destrucción con la beta-catenina que facilita la fosforilación secuencial de la beta-catenina por CKI y GSK3- $\beta$  en el amino terminal. Las fosforilaciones reclutan el F box/WD proteína con repeticiones  $\beta$ -TrCP que contiene E3 ubiquitin ligasa, que marca la beta-catenina para la degradación proteosomal. La vía de señalización Wnt se activa por unión del ligando Wnt al receptor transmembrana Frizzled, un receptor serpentina con dominio amino terminal rico en cisteína. Entonces el complejo interacciona con la proteína transmembrana de paso único de la familia del receptor LDL (LRP5/6). No está claro como el complejo FRZ/LRP regula la actividad quinasa del complejo de destrucción. Sin embargo, se sugiere que la actividad axina/GSK3- $\beta$  es inhibida por un mecanismo que implica la interacción de la axina con LRP5/6 o la acción de la molécula Dishevelled que se une a la axina (DSH). La beta-catenina no fosforilada se transloca al núcleo donde se une al extremo amino de la familia Tcf/Lef (factor de linfocitos T/factor promotor linfóide) de las proteínas de unión a ADN y activa la transcripción de los genes diana. Las proteínas Tcf/Lef reprimen los genes diana en ausencia de la beta-catenina pero se transforman en activadores transcripcionales cuando se han unido a la beta-catenina.
- 15 La relevancia de la vía Wnt para las células cancerosas está indicada por el elevado porcentaje de mutaciones que se producen en los genes en la vía Wnt. Por ejemplo, más del 90% de los cánceres colorrectales muestran unas mutaciones que dan como resultado la activación de la vía Wnt. Estas mutaciones generalmente afectan a la fosforilación y estabilidad de la beta-catenina, dificultando su degradación por la vía de la ubiquitina. La beta-catenina no fosforilada se acumula en el citoplasma, es transportada al núcleo e interacciona con los factores de transcripción de la familia TCF para controlar los genes diana. La acumulación nuclear de la beta-catenina se ha asociado con las etapas tardías de la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis, y la presencia de beta-catenina mutada se asocia con un crecimiento agresivo del tumor y un pronóstico pobre.

Una de las mayores dianas que está vinculada con la formación de metástasis es la proteína de unión al calcio S100A4 (S100A4), una proteína de 11kD, originariamente identificada como metastasina 1(MTS1).

- S100A4 está sobreexpresada en muchos tipos diferentes de cáncer como el de vesícula biliar, vejiga, mama, esófago, gástrico, pancreático, hepatocelular, de pulmón de células no pequeñas y especialmente el cáncer colorrectal. La expresión aumentada de la S100A4 está fuertemente asociada con la agresividad de un tumor, su capacidad para metastatizar y una supervivencia baja de los pacientes. Sin embargo, la proteína S100A4 por sí misma no es tumorigénica porque ratones transgénicos que sobreexpresan S100A4 no desarrollan tumores per se. Pero, cuando los ratones transgénicos S100A4 se cruzan con ratones que muestran una formación espontánea de tumores, conduce a un crecimiento agresivo del tumor y a metástasis. Además, los ratones S100A4 nulo inoculados con células de carcinoma de mama de ratón altamente metastásico no muestran metástasis. Estas observaciones sugieren que el S100A4 es esencial para el proceso de formación de la metástasis.

- S100A4 juega un papel principal en los procesos celulares como la migración, la invasión, la adhesión, que forman las bases para la formación de la metástasis. Por ejemplo, S100A4 incrementa la motilidad celular mediante la interacción con proteínas del esqueleto, como la cadena pesada de la miosina no muscular II (MYH9). Además, S100A4 participa en la adhesión celular por interacción con el receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo F (PTPRF) proteína interaccionante, proteína de unión 1 (PPFIBP1; también conocida como liprina  $\beta$ -1) y promueve la invasión celular y la angiogénesis a través de la sobreexpresión de la metalopeptidasa de la matriz (MMPs).

- A pesar de la intensa investigación que revela la multitud de papeles de S100A4, no se ha descrito ningún inhibidor de la expresión de S100A4 y que este modo inhibe la metástasis mediada por S100A4.

## RESUMEN DE LA INVENCION

- A la luz de la técnica anterior el problema subyacente de la presente invención es proporcionar un inhibidor de la metástasis del cáncer.

Este problema se resuelve a través de las características de las reivindicaciones independientes. Las formas de realización preferidas de la presente invención se proporcionan a través de las reivindicaciones dependientes.

- Por consiguiente la invención se refiere al uso de la niclosamida y sus derivados para la inhibición y/o la reducción de la propagación del cáncer metastásico, especialmente la migración y la invasión de células cancerosas.

- Se llevó a cabo un cribado de alto rendimiento de 1280 pequeñas moléculas para identificar los inhibidores de la expresión del gen marcador dirigido por el promotor S100A4 con una actividad antimetastásica clínica potencial. Se identificó una sustancia altamente efectiva -niclosamida- que un fármaco antihelmíntico aprobado para el tratamiento

de infecciones por tenia. Sorprendentemente, la niclosamida tiene un efecto fuerte sobre la expresión de la S100A4 por inhibición de su transcripción. Además, la niclosamida se puede usar para inhibir la migración e invasión celular inducida por S100A4 así como la proliferación celular y la formación de colonias in vitro.

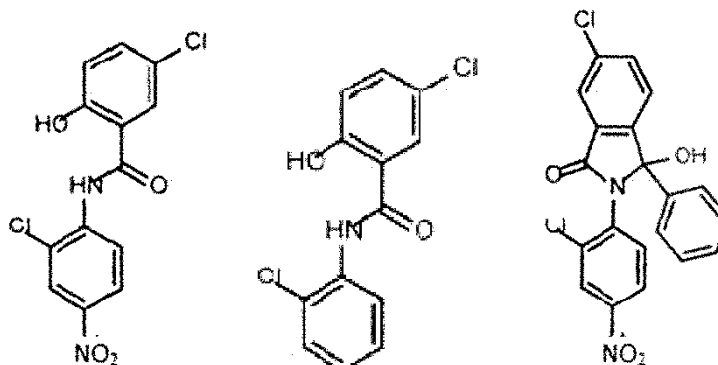
- 5 La migración celular, especialmente la migración celular dirigida, contribuye a crear patologías que incluyen enfermedades vasculares, enfermedades inflamatorias crónicas y la formación de tumores y metástasis. La migración es un proceso dinámico y cíclico en el que la célula extiende una protrusión en su parte delantera que después se une al sustrato del que la célula está migrando. Esto es seguido por una contracción que mueve el cuerpo celular hacia adelante en dirección a la protrusión y finalmente las uniones en la parte trasera de liberación
- 10 mientras la célula continúa moviéndose hacia delante. El ciclo se inicia mediante señales externas (moléculas quimotácticas), que se detectan y se comunican en el interior celular mediante proteínas receptivas especializadas en la membrana celular. En respuesta a estas señales, las células extienden protrusiones, mediante actina polimerizable, buscando nuevo terreno y detectando la dirección desde la que están recibiendo las señales. Una vez que ya se ha establecido la dirección del movimiento, la maquinaria que permite el movimiento se ensambla en
- 15 relación a la dirección de la migración. Complejos adhesivos necesarios para la tracción se reúnen en la parte delantera de la protrusión, uniendo la protrusión al sustrato. Los filamentos de actomiosina se contraen en la parte delantera de la célula y empujan el cuerpo celular hacia la protrusión. La liberación de las conexiones adhesivas en la parte trasera de la célula y la retracción de la cola completan el ciclo. La instrumentación de este complejo proceso reside en muchas moléculas que sirven para distinguir entre la parte delantera y trasera de la célula y cuyas
- 20 acciones se cronometran cuidadosamente. Fue sorprendente observar que la adición de niclosamida o sus derivados a células migratorias o invasoras inhibe ambos procesos, especialmente si los procesos están provocados por S100A4.

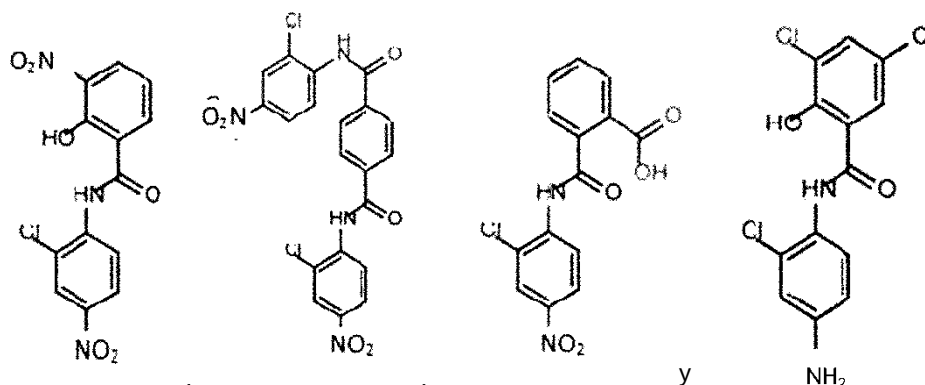
- La niclosamida es un pesticida salicilanílico clorado que se usa principalmente contra organismos acuáticos
- 25 vertebrados y crustáceos. Es un antihelmíntico eficaz para el tratamiento de la difilobotriasis y la himenolepiasis. Se usa para el tratamiento de la tenia (de pescado, enana y de vacuno).

El antihelmíntico es principalmente una sustancia química que se usa para expulsar o destruir la tenia en animales domésticos.

30

Se ha demostrado que ninguno de los diversos derivados de la niclosamida han sido eficaces como la niclosamida. La niclosamida o sus derivados se escogen de entre el grupo que comprende las fórmulas:





Sin embargo, se ha demostrado que algunos derivados de la niclosamida son eficaces para la migración, invasión y metástasis celular producida por S100A4. Los expertos en la técnica conocen varios procedimientos y técnicas químicas para modificar una sustancia química para generar un derivado de la invención, que todavía comprende la base química, como la adición, la supresión o la sustitución de un grupo o un grupo funcional. Niclosamida es conocida también como 2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida, 2-hidroxi-5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)benzamida, 5-cloro-2'-cloro-4'-nitrosalicilanilida, 5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)salicilamida, Bayluscid, 5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-hidroxi Benzamida, Dichlosale, Cestocid o Devermine.

10

La niclosamida y sus derivados se pueden aplicar en células cancerígenas in vitro o in vivo para inhibir la migración, invasión y metástasis celular producida por S100A4. Los cánceres se clasifican preferentemente por el tipo de células a las que el tumor se parece y, por consiguiente, sospechosas de ser el origen del tumor. Estos tipos incluyen:

15

- Carcinoma: Cáncer producido por células epiteliales. Este grupo presenta muchos de los cánceres más comunes, incluyendo los de mama, próstata, pulmón y colon.
- Sarcoma: Cáncer producido por tejido conector o células mesenquimales.
- Linfoma y leucemia: Cáncer producido por células hematopoyéticas.
- Tumor de células germinales: Cáncer producido por células pluripotenciales. En adultos éstas se encuentran frecuentemente en testículos y ovarios.

20

- Blastoma: Un cáncer derivado de un precursor «inmaduro» o tejido embrionario.

En una forma de realización preferida, el cáncer se escoge de entre el grupo comprendido en cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovarios, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, melanoma de piel, cáncer de páncreas u otro cáncer que todavía esté por determinar en el que los niveles de S100A4 son elevados, sobre-regulados, mutados o alterados en su fisiología en comparación con las células no oncogénicas. El cáncer se puede escoger de entre los cánceres relacionados con S100A4. El cáncer puede estar provocado por productos químicos, infecciones, radiación, anomalías genéticas, traumatismos físicos y agentes físicos. Fue sorprendente observar que al niclosamida es muy eficaz para inhibir la migración, invasión y metástasis de varios cánceres en los que la S100A4 está preferentemente sobreexpresada. A la luz de la invención, la sobreexpresión se refiere especialmente a un exceso de la expresión de un gen que produce un exceso de su efecto o de su producto, en el que el producto se refiere preferentemente a proteínas o ARN.

25

30

La niclosamida inhibe eficazmente la expresión de S100A4, lo que afecta a la transcripción del gen S100A4 o a la traducción del ARNm en proteína. Es preferible que la niclosamida o sus derivados module el complejo TCF/proteína beta-catenina en la célula cancerosa. El gen S100A4 es preferiblemente una diana de la vía Wnt y su expresión se activa mediante factores de transcripción, preferentemente el complejo de transcripción TCF/beta-catenina.

35

La modulación del complejo de transcripción preferido TCF/beta-catenina tiene como resultado una parada o inhibición de la transcripción del gen S100A4.

40

La invención además se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un cáncer tumoral que comprende la administración a sujeto que lo necesite o una cantidad eficaz de niclosamida o un derivado suyo.

45

En una forma de realización preferida, el sujeto es preferentemente una persona. Es preferible que la administración de niclosamida o su derivado inhiba o reduzca la expresión de S100A4, preferentemente modulando un complejo de

proteínas que comprende los factores de transcripción de TCF y beta-catenina.

- En una forma de realización preferida, la expresión de S100A4 y la propagación de células cancerígenas metastásicas se reduce o se inhibe incluso más mediante moléculas de ácidos nucleicos, preferentemente a través de ácidos nucleicos con complementariedad al ARNm o a componentes de la vía Wnt. Los procedimientos para la inhibición, bloqueo, supresión, activación o sobreexpresión de un gen son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el bloqueo o supresión de la expresión de un gen se podría realizar mediante un anticuerpo cuya diana sea la proteína traducida, modificación genética de la célula, como delecciones u otras mutaciones diana, o el uso de un ARN anti-sentido, como ARNsi o ARNm, para silenciar la proteína antes de su traducción a ARNm. Sin embargo, también sería preferible activar o sobreexpresar un componente de la vía Wnt. La activación de la sobreexpresión se podría conseguir a través de la administración una proteína activa a la célula o mediante la sobreexpresión la proteína en particular en un vector expresión o mediante la transformación cualquier otro ácido nucleico exógeno que codifica para la proteína que debe aumentar.
- 15 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende niclosamida o un derivado suyo para la inhibición y/o reducción de la propagación de metástasis cancerígena.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende por lo menos una niclosamida o un derivado suyo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicha composición es una cápsula, una píldora o una píldora recubierta, un supositorio, una pomada, una crema, una solución de inyección y/o una solución de infusión.

Es preferible en las células cancerosas que la niclosamida inhiba la formación del complejo TCF/beta-catenina (CTNNB1) y de este modo interrumpa la transcripción del gen diana.

En otra forma de realización preferida, la composición farmacéutica usada comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes de carga, disgregantes, aglutinantes, humectantes, agentes de expansión, retardantes de la disolución, potenciadores de la absorción, agentes tensioactivos, adsorbentes y/o lubricantes. Como resultado, la composición farmacéutica se puede ajustar a las necesidades específicas de varios tipos de cáncer.

En otra forma de realización preferida, el uso de la composición farmacéutica descrita anteriormente comprende niclosamida o derivados suyos y uno o más fármacos quimioterapéuticos. Los fármacos quimioterapéuticos se pueden dividir en agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa y otros agentes antitumorales. Todos estos fármacos afectan de alguna forma a la división celular o a la síntesis y función del ADN.

Ventajas como el bajo coste, la eficacia clínica y la baja influencia de efectos adversos son evidentes en otra forma de realización preferida de niclosamida o derivados suyos, incluyendo el procedimiento para el tratamiento de cáncer, preferentemente metástasis del cáncer en un mamífero que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición al mamífero que necesite dicho tratamiento. Es preferible que el mamífero sea una persona.

En una forma de realización preferida, se pueden alcanzar eficazmente todas las zonas potenciales de metastásicas cancerígenas ya que el procedimiento descrito anteriormente comprende una vía de administración de la composición farmacéutica que se selecciona de entre el grupo consistente en administración oral parenteral, intravenosa, intrarterial, pulmonar, mucosal, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, rectal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, intratecal o intraperitoneal.

Una forma de realización especialmente preferida comprende el procedimiento descrito anteriormente, en el que la vía de administración del compuesto se selecciona de entre una administración oral y parenteral. Esta forma de realización permite el tratamiento eficaz de la metástasis mediante la aplicación de diferentes formas de liberación del compuesto. Las infecciones subcutáneas, por ejemplo, se pueden alcanzar inmediatamente a través de la corriente sanguínea mediante una aplicación intravenosa o, mínimamente invasiva, mediante la aplicación oral o a través de los fluidos intersticiales mediante inyección subcutánea. Conjuntamente, estos diferentes procedimientos para la aplicación ofrecen la posibilidad de antagonizar cualquier metástasis a través de la vía de liberación óptima del compuesto.

La invención también se refiere a la niclosamida o derivados suyos para el tratamiento de metástasis cancerígenas.

En una forma de realización preferida la invención se refiere al tratamiento de un grupo de pacientes que se identifican por un aumento de la expresión de S100A4, preferentemente en los que las células cancerígenas muestran un aumento de la expresión de S100A4. La expresión de S100A4 se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, como RT-PCR para análisis del aumento de la expresión de la transcripción de S100A4 o procedimientos con base inmunológica como western blot o ELISA para la detección de un aumento de la expresión de la proteína S100A4 o cualquier otra herramienta de diagnóstico que pueda proporcionar mediciones relativas de la expresión de S100A4 en comparación con las células "normales" o "sanas" o "de bajo riesgo".

Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere a la niclosamida y derivados suyos para el tratamiento de la prevención de metástasis de células cancerígenas en un paciente o un grupo de pacientes identificados por el aumento de la expresión de S100A4, en el que un fluido corporal y/o un tejido de un paciente que se debe identificar se analiza para determinar los niveles de expresión de S100A4. Los fluidos corporales pueden incluir humor acuoso y humor vítreo, bilis, sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, leche materna, fluido cerebroespinal, cerumen (cera de los oídos), endolinfa y perilinfa, jugos gástricos, mucosidad (incluyendo drenaje nasal y flemas), fluido peritoneal, fluido pleural, saliva, seborrea (aceite de la piel) sudor, lágrimas, secreción vagina, vómitos y orina.

El tratamiento de este grupo particular de pacientes con niclosamida representa un novedoso uso médico de la niclosamida que no se ha sugerido o dado a conocer en técnicas anteriores. El novedoso efecto de la niclosamida en el que se basa la invención representa un efecto técnico novedoso que permite el uso médico novedoso de la niclosamida. La identificación del mecanismo de funcionamiento de la niclosamida en relación a la inhibición de la expresión de S100A4 permite el tratamiento con niclosamida que tiene un efecto directo en la expresión del gen S100A4. La conexión directa entre la expresión de S100A4 y el tratamiento con niclosamida no se ha propuesto o sugerido con anterioridad en técnicas anteriores. El conocimiento del efecto directo de la niclosamida en la expresión de S100A4 permite pautas de dosificación que se ajustan con precisión a las necesidades del paciente, permitiendo de este modo la administración directamente a las zonas del cuerpo afectadas en cantidades que presentan un efecto relevante sin provocar efectos secundarios no deseados. Este tratamiento se puede realizar, por ejemplo, mediante el tratamiento directo del cáncer colorrectal en sujetos con cáncer de colon proporcionando de este modo una prevención eficaz de metástasis. La aplicación oral también es preferible debido a la baja toxicidad después de una administración sistémica.

La expresión de S100A4 en tumores en pacientes con cáncer de colon demostró ser pronóstica para el desarrollo de la metástasis. Además, recientemente se ha demostrado en el estado de la técnica que la determinación cuantitativa de transcripción de S100A4 en plasma en pacientes con cáncer de colon es un pronóstico y diagnóstico para cánceres en fase temprana y la definición de pacientes en alto riesgo de metástasis provocadas por S100A4. La niclosamida, sin embargo, es un novedoso inhibidor de la interacción de TCF/beta-catenina (CTNNB1) que afecta a la metástasis provocada por S100A4 que no se había propuesto anteriormente en combinación con S100A4.

La aplicación médica de la niclosamida para prevenir y/o reducir la expresión de S100A4 y, por consiguiente, prevenir la metástasis representa una combinación novedosa entre la indicación médica (prevención de metástasis) y el producto (niclosamida) unido a un efecto técnico novedoso (prevención y/o inhibición de la expresión de S100A4) que es impredecible a la luz de usos conocidos de la niclosamida y la función previamente conocida de S100A4. Este efecto técnico novedoso también conlleva beneficios inesperados, como un aumento de la supervivencia de pacientes tratados con las sustancias de la presente invención, además de niveles de S100A4 bajos incluso mucho tiempo después (semanas) de que el tratamiento haya finalizado. No se esperaba que el tratamiento con niclosamida a través de la inhibición directa de la expresión de S100A4 proporcionara más prevención de la metástasis y de la migración de células cancerígenas.

La invención también se refiere a la niclosamida y derivados suyos para el tratamiento de metástasis cancerígena, incluyendo la inhibición y/o reducción de metástasis ya existentes y/o la prevención de la formación de metástasis cancerígenas. En una forma de realización preferida, la niclosamida o un derivado suyo según la invención se puede aplicar en dosis terapéuticamente eficaces a un paciente con riesgo de metástasis, por ejemplo, un paciente que ya esté bajo tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con el cáncer en las que puede surgir una metástasis.

#### Descripción detallada de la invención

La invención describe la identificación de inhibidores de moléculas pequeñas (niclosamida y derivados suyos), que reduce significativamente la expresión de S100A4, especialmente en células de carcinoma colorrectal y específicamente interfieren con la migración e invasión celular provocada por S100A4.

Se presenta un cribado de alto rendimiento que identifica la molécula pequeña antihelmíntica niclosamida como un

inhibidor de transcripción de la expresión de S100A4 que forman la base de esta acción antimetastática novedosa. Se ha demostrado que, especialmente las células del cáncer de colon, la niclosamida inhibe la señal de la vía WNT/beta-catenina (CTNNB1). Por consiguiente, bloqueó la expresión de S100A4 de una forma dependiente de la concentración y del tiempo. Además, la niclosamida impide la migración e invasión celular inducida por S100A4 así como la proliferación celular y la formación de colonias in vitro. Consistentemente, los ratones que presentan un xenotransplante de cáncer de colon presentaron una reducción clara de los niveles de expresión de S100A4 dentro del tejido tumoral cuando los ratones son tratados con niclosamida o sus derivados. Además el tratamiento con niclosamida, incluso cuando se interrumpe después de 24 días da como resultado menos metástasis hepáticas y más pequeñas en los ratones xenotransplantados.

El cribado de alto rendimiento tiene como objetivo la identificación de inhibidores de la transcripción de S100A4. Para esto, se usaron las células HCT116-S100A4p-LUC como modelo de cáncer de colon humano, puesto que estas células presentan una vía de señalización WNT constitutivamente activa debido a una mutación monoalélica de CTNNB1. De este modo, estas células muestran una actividad del promotor S100A4 endógenamente elevada que permite una expresión constante del gen marcador. El cribado de 1280 compuestos de la biblioteca LOPAC identificó la niclosamida como el inhibidor más prometedor de la expresión de S100A4 para las pruebas in vivo.

La niclosamida es un fármaco antihelmíntico que puede ser dividido hidrolíticamente por las células del tracto gastrointestinal. El metabolismo de la niclosamida por las células tumorales podría explicar que la inhibición de la expresión de la S100A4 fue interrumpida incluso por pequeños cambios en la estructura de la niclosamida. La variación en la solubilidad acuosa puede ser un factor adicional subyacente a este resultado inicial de la estructura-actividad.

El efecto decreciente de S100A4 con una sola dosis de niclosamida se limitó a un marco temporal de 24 horas. Sin embargo, este marco de tiempo se podría prolongar mediante la aplicación de dosis diarias de niclosamida para conseguir una reducción constante de la expresión de S100A4 in vitro e in vivo. Una vez se haya conseguido este nivel, la supresión de S100A4 inducida por la niclosamida junto con la inhibición de la motilidad y la proliferación celular se mantienen estables incluso después de que se haya interrumpido el tratamiento con niclosamida.

La inhibición de la expresión de S100A4 por experimentos de ARNhc o la sobreexpresión de los inhibidores endógenos tales como fosfolipasa PLA2G2A o interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tiene como resultado una motilidad celular e invasividad reducidas. De acuerdo con este resultado, el tratamiento con niclosamida, de por ejemplo, las células de cáncer de colon, conduce a una migración celular así como invasión reducidas. El efecto inhibidor de la niclosamida sobre la motilidad celular puede ser superado por la sobreexpresión ectópica de la S100A4. Estas observaciones enfatizan de nuevo el papel central de la S100A4 sobre la motilidad celular que lleva a la metástasis del cáncer de colon.

Se había observado previamente en experimentos de ARNi que la depresión de los niveles de S100A4 dio como resultados la parada de la fase G2/M de las células cancerosas pancreáticas y tasas de proliferación reprimidas en las células de cáncer gástrico. Se había demostrado que el tratamiento con niclosamida tuvo como resultado una reducción de la expresión de S100A4 y simultáneamente una reducción de la proliferación celular. Sin embargo, estos efectos parecen ser independientes puesto que la sobreexpresión de S100A4 no puede superar el efecto antiproliferativo de la niclosamida.

La mutación de la vía WNT es una etapa fundamental para el desarrollo de cáncer de colon que conduce a una actividad constitutiva de la vía y la expresión del gen diana. La actividad de la vía WNT juega un papel central en la homeostasis del colon. La interferencia con esta vía por lo tanto conlleva el riesgo de unos efectos adversos no deseados. La niclosamida como fármaco aprobado por la Administración de medicamentos y alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) se usa en la clínica para el tratamiento de la helmintiasis donde ha probado que sólo tiene unos efectos adversos leves en humanos cuando se toma por vía oral. En los modelos de ratones con xenotransplante se encontró que las concentraciones no tóxicas fueron eficaces en la reducción del nivel de expresión de la S100A4 dentro del tejido tumoral y la reducción sustancial de metástasis hepática. De forma interesante, la acción inhibidora in vivo del tratamiento interrumpido con niclosamida fue casi tan fuerte como en los ratones que tratados de forma continua con niclosamida. A pesar de la interrupción del tratamiento con niclosamida, la expresión de S100A4 en los tumores de bazo así como la formación de metástasis hepáticas fue inhibida durante 26 días después de la finalización del tratamiento. Además, el tratamiento interrumpido con niclosamida todavía tuvo un efecto importante en la prolongación de la supervivencia global.

El término «ácidos nucleicos» se refiere una molécula de ácido nucleico ADN o ARN, ya sea de hebra sencilla o de doble hebra, como es entendido habitualmente por un experto en la técnica. Los ácidos nucleicos preferidos de la

presente invención se refieren a los vectores de expresión de ADN, plásmidos, moléculas de ARN.

El término «ácidos nucleicos exógenos» se refiere a los ácidos nucleicos que no se han originado a partir de la célula que se ha transformado. La secuencia de ácido nucleico puede estar contenida dentro del genoma del organismo en que se transforma la molécula de ácido nucleico. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico por sí misma se debe transformar en el interior de las células dianas, originando de este modo desde una fuente externa. Dichos ácidos nucleicos exógenos pueden ser de naturaleza sintética, puede ser producidos de forma recombinante o ser purificados o extraídos a partir de otros organismos o células madre desde cualquier otra fuente externa a la célula que se va a transformar. En la presente invención, la naturaleza exógena no necesariamente se refiere a la secuencia de la molécula nucleica pero sí a su origen. La molécula que entonces es codificada por el ácido nucleico puede por consiguiente ser una proteína o un péptido también codificado por el genoma de la célula receptora.

La introducción de ácidos nucleicos exógenos se puede llevar a cabo mediante transfección, transducción, transformación o cualquier otro proceso de modificación o transformación genética. Puede tener lugar naturalmente, como ocurre cuando un virus infecta unas células o bien artificialmente. Los métodos de transfección artificial incluyen pero no se limitan a los métodos químicos que incluyen la precipitación de fosfato cálcico, DEAE - formación de complejo con dextrano y la transferencia de ADN mediada por lípidos, métodos físicos que incluyen electroporación, microinyección y suministro de partículas biolísticas (cañón de genes) y el uso de virus recombinados manipulados en el laboratorio como vectores.

El término "transformación" se refiere a llevar unos ácidos nucleicos exógenos en el interior de la célula a través o bien métodos naturales o químicos.

El término "derivado" se refiere a cualquier cambio en un compuesto base definido en la presente solicitud. El término «derivado» se usa para describir un compuesto que puede ser un agente eficaz por sí mismo/por su propio derecho o en la forma derivada. Los derivados preferidos son los que se proporcionan en la Figura 5A. Una derivación adicional en cada uno de los residuos modificados es conocida por un experto en la técnica y por lo tanto otros derivados están incluidos en la presente invención. Por ejemplo, halógenos adicionales en varias posiciones ocupadas por Cl son derivados obvios que están incluidos en el alcance de la presente invención.

Tal como se usa en la presente memoria "composición farmacéutica" significa una composición que comprende niclosamida o su derivado de modo que la composición se puede usar de forma segura y eficazmente como productos para obtener o conseguir un resultado deseado. El término «composición farmacéutica» tal como se usa en la presente memoria significa composiciones que resultan de la combinación de componentes individuales que ellos mismos son farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, cuando se prevé la administración intravenosa, los componentes son adecuados o aceptables (tanto en calidad como en cantidad) para la administración intravenosa. La niclosamida o sus derivados se pueden administrar a mamíferos, especialmente a humanos, usando varias vías de administración, como intravenosa, subcutánea o intramuscular. La dosis administrada debe ser considerada por la persona experta en la técnica de modo que sea terapéuticamente eficaz como terapia para tratar o evitar los síntomas de cáncer, principalmente la metástasis.

La descripción presentada en esta memoria va dirigida a una composición farmacéutica que puede ser administrada a través de varias vías que incluyen la vía oral, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular o directamente en o sobre el individuo afectado. Cuando la composición farmacéutica se suministra mediante una inyección, la inyección de niclosamida o su derivado puede ser mediante una inyección única o varias inyecciones dentro o fuera del cuerpo y la(s) inyección/inyecciones se puede dar en un solo día o durante varios días. La dosis diaria se administra a un sujeto de forma que la cantidad diaria de niclosamida suministrada a un sujeto a partir de la composición farmacéutica sea aproximadamente la que es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de los síntomas asociados al cáncer, especialmente la metástasis. Además, la composición farmacéutica puede incluir opcionalmente unos componentes adicionales como sales, estabilizantes y antimicrobianos sin alejarse de la esencia y el alcance de la invención reivindicada. La composición farmacéutica de la presente invención contiene niclosamida o sus derivados y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad y la naturaleza de la niclosamida o sus derivados que se van a incorporar en la composición puede variar en función del efecto terapéutico deseado y del periodo de tiempo durante el cual la composición proporciona un efecto terapéutico. La cantidad de niclosamida o sus derivados en la composición farmacéutica es la que suministrará una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de los síntomas asociados al cáncer, especialmente la metástasis. Evidentemente, la concentración y el carácter de la niclosamida o sus derivados que se va a incluir en la composición farmacéutica variará en función de los componentes usados en la composición farmacéutica, la vía por la que se administra, los síntomas y detalles del cáncer que requiere tratamiento así como

otros factores conocidos para los expertos en la técnica.

El uso de los términos "paciente" o "persona" se puede intercambiar en la presente memoria, y se refieren a mamíferos, que incluyen pero no se limitan a primates incluido simios y humanos.

5

Tal como se usan, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren al hecho de obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de una metástasis cancerígena y/o puede ser terapéutica en términos de una curación parcial o completa para la metástasis cancerígena y/o efectos adversos atribuibles a la enfermedad. "Tratamiento" tal como se utiliza en el

10 presente documento, se refiere a una enfermedad en un mamífero, particularmente en una persona, e incluye: (a) la prevención de que la enfermedad aparezca en un sujeto que padece cáncer; (b) la inhibición de la enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo y metástasis; y (c) mitigar la enfermedad, es decir, provocar una regresión de la enfermedad.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" se define además como la aplicación o administración de uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención que incluyen niclosamida en un sujeto, en el que el sujeto padece cáncer como se ha indicado anteriormente en el presente documento, síntomas asociados con el cáncer, en el que el propósito es la curación, alivio, mitigación, alteración, remedio, mejora o afectar al cáncer, preferentemente metástasis cancerígena.

20

Sin embargo, los tratamientos "terapéutico" y "profiláctico" se deben considerar en un contexto más amplio. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un sujeto sea tratado hasta su completa recuperación. Similarmente, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no desarrolle en algún momento síntomas que están asociados a la metástasis cancerígena.

25

Por consiguiente, el tratamiento terapéutico y profiláctico incluye una mejora de los síntomas de una enfermedad en particular o una prevención o si no una reducción del riesgo a desarrollar una enfermedad en particular. El término "profiláctico" se puede considerar como una reducción de la gravedad o de la aparición de una enfermedad en particular, preferentemente metástasis. "Terapéutico" también puede reducir la gravedad de una enfermedad

30

existente.

Los términos aplicación y administración se utilizan como sinónimos en el presente documento y se refieren al uso de una composición o compuesto farmacéutico para tratar a un paciente.

35 El término "dosis eficaz" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de un ingrediente activo suficientemente elevada como para (a) prevenir que la enfermedad aparezca en un sujeto que puede padecer cáncer; (b) inhibir la enfermedad, es decir, parar su metástasis; y (c) mitigar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la metástasis, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves. Una cantidad segura y eficaz de un ingrediente activo puede variar con la formulación galénica específica, la composición

40

Tal como se utiliza en el presente documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los solventes, dispersores de medio, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso isotónicos y de absorción, tampones, soluciones de vehículos, suspensiones, coloides y similares. El uso de estos medios y

45

agentes en sustancias farmacéuticamente activos es conocido en la técnica. Excepto en el caso de que un medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

Vehículos fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son las

50

soluciones acuosas estériles que no contienen materiales aditivos en los ingredientes activos y agua, o contienen un tampón como fosfato de sodio con un valor fisiológico de pH, solución salina fisiológica o ambos, como solución salina tamponada de fosfato. Además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponada, así como sales como los cloruros de sodio y de potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otras soluciones. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de agua y excluyendo agua. Ejemplos de

55

dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales como aceite de algodón, ésteres orgánicos y oleato de etilo y emulsiones de agua-aceite. Una composición farmacéutica contiene niclosamida o un derivado suyo en la presente invención.

La bioviabilidad oral de la niclosamida es preferentemente un 10%, por consiguiente el tratamiento por vía oral en

60

mamíferos con una dosis de 50 mg/kg - 400 mg/kg, preferentemente 100 mg/kg - 350 mg/kg, más preferentemente

150 - 300 mg/kg de niclosamida es posible, la sustancia también se podría aplicar intraperitonealmente. De acuerdo con los estudios de la OMS, los ratones alimentados crónicamente con 200 mg/kg no mostraron efectos adversos durante un periodo total de dos años de observación. La conclusión, a partir de estos estudios, es que la administración de niclosamida durante un largo periodo de tiempo no presenta efectos adversos en animales sanos.

- 5 Esto representa un beneficio significativo en la aplicación de niclosamida para el tratamiento y prevención de la metástasis, ya que se puede administrar en dosis relativamente altas sin efectos adversos.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacción alérgica inapropiada o similar cuando se administra a un paciente.

10

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en el presente documento significa cualquier material o sustancia con la que el ingrediente activo (niclosamida o un derivado suyo) se formula para facilitar su aplicación o diseminación al locus que se ha de tratar, por ejemplo, mediante la disolución, dispersión o difusión de dicha composición y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin afectar a su eficacia. El

15 vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido, un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, vaporizadores, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, pastillas, píldoras o pulverizadores.

- 20 El compuesto de la composición farmacéutica que se da a conocer en el presente documento y que contiene el ingrediente activo puede presentarse en una forma adecuada para el uso oral, por ejemplo, píldoras, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para la elaboración de composiciones o compuestos farmacéuticos y dichas
- 25 composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados de entre el grupo consistente en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes preservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente eficaces y sabrosas. Las píldoras contienen el ingrediente activo en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de píldoras. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, como carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y otros agentes desintegradores además de la niclosamida o derivados suyos, por
- 30 ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Las píldoras pueden no estar recubiertas o pueden estar recubiertas mediante técnicas conocidas para retardar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo una acción sostenida durante un largo periodo de tiempo. Por ejemplo,
- 35 se puede utilizar un material retardador de tiempo como glicerol monoestearato o glicerol distearato. También pueden estar recubiertas mediante las técnicas descritas en la U.S. Pat. Nos. 4.256.108; 4.166.452; y 4.265.874, para formar píldoras terapéuticas osmóticas para controlar la liberación. Una composición farmacéutica también puede contener, o alternativamente contener, uno o más fármacos que pueden estar unidos a un agente modular o pueden estar libres en la composición. Virtualmente se puede administrar cualquier fármaco en combinación con la
- 40 niclosamida o derivados suyos dados a conocer en el presente documento y un agente de modulación adicional, por diversos motivos descritos a continuación. Ejemplos de tipos de fármacos que se pueden administrar con niclosamida o derivados suyos y un agente de modulación incluye analgésicos, anestésicos, antianginales, antifúngicos, antibióticos, fármacos anticancerígenos (por ejemplo, taxol o mitomicina C), antiinflamatorios (por ejemplo, ibuprofeno e indometacina), antelmínticos, antidepresivos, antidotos, antieméticos, antihistamínicos,
- 45 antihipertensivos, antimalaria, agentes antimicrotúbulos (por ejemplo, colchicina o alcaloides de la Vinca), agentes antimigraña, antimicrobiales, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, agentes antiseñales (por ejemplo, inhibidores de la proteína quinasa C o inhibidores de la movilización intracelular de calcio, antitusivos, antivirales, supresores del apetito, fármacos cardioactivos, fármacos de dependencia química, catárticos, agentes quimioterapéuticos, vasodilatadores coronarios, cerebrales o periféricos, agentes anticonceptivos, sedantes, diuréticos, expectorantes,
- 50 factores de crecimiento, agentes hormonales, hipnóticos, agentes inmunodepresivos, antagonistas narcóticos, parasimpatomiméticos, calmantes, estimulantes, simpatomiméticos, toxinas (por ejemplo, toxina de la cólera) tranquilizantes y antiinfecciosos urinarios.

- Las formulaciones o composiciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en
- 55 las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolina, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa,
- 60 hidroximetilcelulosa, goma tragacanto y goma acacia; agentes de dispersión o humectantes pueden ser una

- fosfatida natural, por ejemplo lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación del óxido de etileno con alcoholes de cadena alifática larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación del óxido de etileno con esteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol como polioxietileno con esteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietileno de sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más preservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, como sacarosa o sacarina.
- 10 Las suspensiones aceitosas se pueden formular mediante la suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes como los descritos anteriormente y agentes aromatizantes se pueden añadir para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estas composiciones se pueden preservar mediante la adición de un antioxidante como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más preservantes. Ejemplos de agentes dispersores o humectantes y agentes de suspensión adecuados, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes también pueden estar presentes.

Los términos "compuesto activo" o "ingrediente activo" hacen referencia en la presente invención especialmente a niclosamida o derivados suyos.

- 25 La preparación de un compuesto activo que contiene una proteína como ingrediente activo es conocida en la técnica. Normalmente, dichos compuestos se preparan como inyectables, tanto como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar.
- 30 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es preferentemente una cantidad suficiente para inhibir, parcial o completamente, la metástasis de un cáncer.

Aunque la invención se ha descrito en relación a las formas de realización y ejemplos específicos, se debería tener en cuenta que otras formas de realización que utilicen el concepto de la presente invención son posibles sin alejarse del alcance de la invención. La presente invención se define por los elementos de las reivindicaciones y todas y cada una de las modificaciones, variaciones o equivalentes que se enmarcan dentro del espíritu y el alcance de los principios en los que se basa.

## EJEMPLOS

### 40 Ejemplo 1: Cribado de alto rendimiento para los inhibidores de S100A4

Unas células de cáncer de colon que expresan de forma estable un constructo del gen marcador de la luciferasa dirigido por un promotor humano de S100A4, HCT116-S100A4p-LUC se cribaron con la biblioteca de compuestos farmacológicamente activos (LOPAC; Figura 1, A). La biblioteca LOPAC representan una colección de 1280 inhibidores bien caracterizados de células pequeñas. En un cribado primario de 4-concentraciones, se encontró que 34 compuestos inhiben la expresión de la luciferasa dirigida por el promotor de S100A4 en más del 50% en comparación con las células control tratadas con DMSO (Figura 1B). En paralelo, se determinó la viabilidad celular usando un ensayo por el método de azul de Alamar para evaluar si algunos de los efectos inhibidores eran causados por una citotoxicidad (datos no mostrados). De los 34 compuestos efectivos, 11 compuestos inhibieron más eficazmente la expresión del gen indicador a unas concentraciones que no fueron tóxicas o afectaron solo ligeramente la viabilidad celular. Para confirmar la capacidad inhibidora de los compuestos seleccionados y para establecer más precisamente las curvas de concentración-repuesta, estos 11 compuestos se titularon usando un cribado de nuevo de 20-concentraciones con pocillos por triplicado de diluciones dobles con la mayor concentración de ensayo de 100 µM. Los ensayos de concentración-respuesta confirmaron que la niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilánilida) fue el candidato más fuerte con respecto a la inhibición de la expresión del gen indicador (Figura 1,C).

### 60 Ejemplo 2: Efecto de la niclosamida sobre el ARNm y la expresión de la proteína S100A4

Para determinar la concentración aplicable de niclosamida, se analizó la citotoxicidad de la niclosamida sobre las células HCT116. La exposición de las células HCT116 a concentraciones crecientes de niclosamida redujo la viabilidad celular de un modo dependiente de concentración ( $CE_{50} = 2,2 \mu M$ ; 95%  $IC_{1,87a} 2,92 \mu M$ ) (Figura 2, A). Seleccionando un intervalo de concentración desde  $0,1 \mu M$  a  $2,5 \mu M$  de niclosamida, se analizó la expresión de S100A4 endógena en las células HCT116 y se encontró que ARNm de S100A4 y los niveles de proteína se redujeron de un modo dependiente de concentración (Figura 2, B). Las concentraciones superiores a  $0,5 \mu M$  de niclosamida redujeron la cantidad de ARNm de S100A4 endógeno a menos del 50% de los controles tratados con solvente (control vs niclosamida,  $1 \mu M$  media 47,4%, IC 95%, 39,3% a 55,4%;  $P < .01$ ,  $1,5 \mu M$  media 39,2%, IC 95% 11,4% a 89,7%;  $P < .01$ ,  $2 \mu M$  media 39,1%, IC 95% 18,3% a 59,9%,  $P < .01$ ,  $2,5 \mu M$  media 36,7%, CI 95% 18,6% a 54,8%;  $P < .001$ ). Se observaron efectos similares a nivel de la proteína S100A4. No se pudo detectar ningún cambio de expresión de S100A4 con concentraciones inferiores a  $1 \mu M$  de niclosamida. Con respecto a la concentración óptima que mostró una citotoxicidad mínima y una inhibición máxima de la expresión de S100A4, se usó niclosamida  $1 \mu M$  en otros experimentos.

Después se analizó la dependencia del tiempo de la reducción mediada por niclosamida de la expresión de S100A4. Después de una sola dosis de niclosamida los niveles de ARNm y la proteína S100A4 en las células HCT116 se redujeron a menos del 50% después de 18 horas y 24 horas, respectivamente (control vs niclosamida, 18 horas media 47,5%, IC 95% 43,9% a 51,1%;  $P < .001$ ; 24 horas media 47,4%, IC 95% 39,4% a 55,4%,  $P < .001$ ), pero volvió al nivel control después de 30-48 horas (Figura 2, C). Cuando las células HCT116 son tratadas diariamente con niclosamida al  $1 \mu M$ , se observó una reducción constante del ARNm de S100A4 y los niveles de proteínas a aproximadamente el 50% de las células control tratadas con solvente (control vs niclosamida, 24 horas media 46,0%, IC 95% 38,7% a 53,3%,  $P < .001$ ; 48 horas media 44,5%, IC 95% 32,2% a 56,8%,  $P < .001$ ; 72 horas media 59,5%, IC 95% 50% a 69,2%,  $P < .001$ ) (Figura 2, D).

De forma similar a las células HCT116 de tipo natural, la exposición de las células HCT116-vector a niclosamida también mostraron aproximadamente el 50% de inhibición de la expresión de S100A4 comparado con las células control tratadas con solvente (HCT116-vector control vs niclosamida, media 100% vs 57,8%, diferencia media 42,0%, IC 95% 31,9% a 52,1%,  $P < .0001$ ) (Figura 2, E). En las células HCT116-S100A4, el nivel de ARNm de S100A4 fue 6 veces superior que las células HCT116-vector porque la expresión ectópica del constructo de ADNC de S100A4 dirigido por el promotor de CMV. Por consiguiente, la expresión de la proteína S100A4 aumentó en las células HCT116-S100A4. Al contrario de las células HCT116-vector, la exposición de HCT116-S100A4 a niclosamida dio como resultado una no reducción del ARNm de S100A4 (HCT116-S100A4 control vs niclosamida, media 717,0% vs 612,3%, diferencia media 104,7%, IC 95% -110,0 a 319,5, no estadísticamente significativa) y los niveles de proteína.

### Ejemplo 3: Efecto de la niclosamida sobre la migración celular y la invasión inducida por S100A4

S100A4 es el regulador principal de la motilidad celular. De este modo, se analizó el efecto de la niclosamida sobre la migración celular inducida por S100A4 sobre las células HCT116-vector y HCT116-S100A4. El número de células migradas se inhibió en las células HCT116-vector en presencia de niclosamida (control vs niclosamida, media 100,0% vs 43,0%, diferencia media 57,0%, IC 95% 40,3% a 73,7%,  $P < .0001$ ) (Figura 3, A). Al contrario, las tasas de migración de las células HCT116-S100A4 no mostraron una reducción con el tratamiento con niclosamida (control vs niclosamida, media 145,0% vs 117,0%, diferencia media 28%, IC 95% -7,8% a 63,9%, no estadísticamente significativa).

También se determinaron las tasas de invasión de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4, ya que se sabe bien que S100A4 estimula la invasión celular. El número de células invadidas disminuyó en las células HCT116-vector tratadas con niclosamida (control vs niclosamida, media 100% vs 30,1%, diferencia media 69,9%, IC 95% 10,9% a 128,9%,  $P = .021$ ) (Figura 3, B). Al contrario, el tratamiento con niclosamida no tuvo efecto sobre las tasas de invasión de las células HCT116-S100A4 (control vs niclosamida, media 111,4% vs 122,5%, diferencia media -11,1%, IC 95% -54,9% a 32,8%, no estadísticamente significativa).

Además, se analizó el efecto de la niclosamida sobre la migración dirigida en el ensayo de cierre de herida. En ausencia de niclosamida las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 cerraron completamente la herida inserta después de 4 días (Figura 3, C). El cierre de la herida se vio perjudicado en las células HCT116-vector tratadas con niclosamida. Al contrario, las células HCT116-S100A4 tuvieron la capacidad de migrar dentro de la herida y cerrar el orificio a pesar de la presencia de la niclosamida. En resumen, la exposición a niclosamida restringió la motilidad de las células y su invasividad. Este efecto fue específico para S100A4 ya que la sobreexpresión ectópica de S100A4 supera la inhibición mediada por niclosamida de la motilidad celular.

**Ejemplo 4: Efecto de la niclosamida sobre el crecimiento celular dependiente e independiente de anclaje**

Se midió la proliferación celular dependiente de anclaje en presencia o ausencia de niclosamida y dependiente del nivel de expresión de S100A4. La exposición de las células HCT116-vector y las células HCT116-S100A4 a la niclosamida tuvo como resultado una reducción de la proliferación celular en ambas líneas celulares independientemente del nivel de expresión de S100A4 (Figura 3 D). El crecimiento celular independiente de anclaje se analizó mediante un ensayo de formación de colonias. Las células HCT116-vector tratadas con solvente y las células HCT116-S100A4 fueron ambas capaces de formar colonias grandes en un plazo de siete días (Figura 3 E). Sin embargo, el tratamiento con niclosamida reduce claramente el tamaño de las colonias de las células HCT116-vector y las células HCT116-S100A4. Además, el número de colonias de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 se redujo seriamente (HCT116-vector control vs niclosamida, media 100% vs 6,8%, diferencia media 93,2%, IC 95%, 84,2 a 102,2%,  $P < 0.001$ ; HCT116-S100A4 control vs niclosamida, media 105,8% vs 5,0%, diferencia media 100,7%, IC 95%, 89,5% a 11,9%,  $P < 0.001$ ) (Figura 3 F). En resumen, la inhibición de la proliferación celular y la formación de colonias por la niclosamida fue independiente del nivel de expresión endógena o ectópica de S100A4.

**Ejemplo 5: Efecto de niclosamida sobre la proliferación y motilidad inducidas por S100A4 de las células humanas de cáncer de colon**

Después se analizaron los efectos de la niclosamida en la expresión de S100A4 en las líneas celulares de cáncer de colon SW620, LS174T, SW480 y DLD-1. El tratamiento con niclosamida redujo el nivel de ARNm de S100A4 en las células SW620, LS174T y SW480 a menos del 30% del respectivo control tratado con solvente (SW620 control vs niclosamida, media 100,0% vs 31,2%, diferencia media 68,8%, IC 95% 49,1% a 88,5%,  $P < .0001$ ; LS174T control vs niclosamida, media 65,5% vs 13,5%, diferencia media 51,9%, IC 95% 38,3% a 65,6%,  $P < .0001$ , SW480 control vs niclosamida, media 41,0% vs 6,0%, diferencia media 35,0%, IC 95%, 27,1% a 42,9%,  $P < .0001$ ) (Figura 4, A). En las células DLD-1 el ARNm de S100A4 fue apenas detectable y se mantuvo sin cambios bajo el tratamiento con niclosamida. Además, la niclosamida redujo la expresión de la proteína S100A4 en las células SW620, LS174T y SW480, mientras que no se detectó proteína S100A4 en el solvente y en las células DLD-1 tratadas con niclosamida.

El tratamiento con niclosamida redujo la tasa de migración celular de las células SW620, LS174T y SW480 a menos del 50% del respectivo control tratado con solvente (SW620 control vs niclosamida, media 100,0% vs 47,9%, diferencia media 52,1%, IC 95% 25,4% a 78,9%,  $P = .0005$ ; LS174T control vs niclosamida, media 68,2% vs 26,8%, diferencia media 41,3%, IC 95% 16,3% a 66,3%,  $P = .0024$ , SW480 control vs niclosamida, media 21,7% vs 10,6%, diferencia media 11,1%, IC 95%, 1,2% a 2,1%,  $P = .0297$ ). Las células DLD-1 tratadas con solvente presentaron la menor tasa de migración, que no se vio más afectada por el tratamiento con niclosamida (Figura 4, B). De forma similar, la inhibición celular de las células SW620, LS174T y SW480 a menos del 30% del respectivo control tratado con solvente (SW620 control vs niclosamida, media 100,0% vs 25,1%, diferencia media 74,9%, IC 95% 48,4% a 101,4%,  $P < .0001$ ; LS174T control vs niclosamida, media 63,2% vs 23,6%, diferencia media 39,5%, IC 95% 8,7% a 70,4%,  $P = .013$ , SW480 control vs niclosamida, media 47,7% vs 12,8%, diferencia media 34,9%, IC 95%, 12,3% a 57,5%,  $P = .0031$ ) (Figura 4, C). La baja tasa de invasión de las células DLD-1 tratadas con solvente no se vio afectada por el tratamiento con niclosamida. La migración directa de células SW620, LS174T, SW480 y DLD-1, medida en el ensayo de cierre de la herida, se vio perjudicado por el tratamiento con niclosamida en comparación con el control respectivo tratado con solvente (Figura 4 D). Consistente con su baja tasa de migración, las células DLD-1 tratadas con solvente no cerraron la herida hasta el día 4.

La proliferación celular dependiente de anclaje de las cuatro líneas celulares se inhibió bajo el tratamiento con niclosamida (Figura 4, E). Además, el crecimiento independiente de anclaje se vio perjudicado cuando las células SW620, LS174T, SW480 y DLD-1 se expusieron a la niclosamida, dando como resultado colonias celulares claramente más pequeñas (Figura 4 F). El tratamiento con niclosamida redujo el número de colonias a menos del 50% en las cuatro líneas celulares de cáncer de colon (SW620 control vs niclosamida, media 100,0% vs 3,6%, diferencia media 96,4%, IC 95% 78,0% a 114,8%,  $P < .0001$ ; LS174T control vs niclosamida, media 90,6% vs 15,9%, diferencia media 74,6%, IC 95% 58,3% a 91,0%,  $P < .0001$ ; SW480 control vs niclosamida, media 68,1% vs 4,3%, diferencia media 63,8%, IC 95% 52,2% a 75,4%,  $P < .0001$ ; DLD-1 control vs niclosamida, media 82,6% vs 10,1%, diferencia media 72,5%, IC 95% 52,5% a 92,4%,  $P < .0001$ ) (Figura 4, G). En resumen, en las células de cáncer de colon con niveles de expresión de S100A4, la niclosamida inhibió la migración y la invasión celular. La proliferación celular se inhibió independientemente del nivel de expresión de S100A4.

**Ejemplo 6: Eficiencia de los derivados de la niclosamida sobre la expresión y la migración celular S100A4**

Se analizó el efecto de cambios estructurales en la molécula de niclosamida sobre su capacidad de limitar la

expresión de S100A4 (Figura 5 A). Para comparar la eficiencia de la niclosamida y sus derivados para inhibir la expresión de S100A4, se aplicó a todos los compuestos según las condiciones de tratamiento definidas para la niclosamida. En contraste con los efectos observados de la niclosamida, no se detectó reducción del ARNm de S100A4 y niveles de proteínas en ninguno de los seis derivados de la niclosamida (Figura 5 B). Sin embargo, otros derivados sí mostraron un descenso significativo de las tasas de migración al analizar la migración celular (Figura 5 C). En resumen, ninguno de los derivados de la niclosamida alcanzó el efecto de la niclosamida para impedir la expresión de S100A4 y la motilidad celular inducida por S100A4. Sin embargo, otros derivados mantuvieron un efecto contra la motilidad celular y mostraron resultados más eficaces en algunos aspectos, por ejemplo en velocidad o efecto en varios modelos en adición a mejoras potenciales en solubilidad y formulación farmacéutica potencial. Se concluyó que estos cambios en la estructura de la niclosamida dan como resultado una pérdida de su eficacia sobre la inhibición de la expresión de S100A4 pero proporcionan otros efectos potencialmente beneficiosos.

#### **Ejemplo 7: Efecto de la niclosamida sobre la señalización WNT constitutivamente activa**

Como se ha publicado anteriormente las células HCT116 son heterocigotas para *CTNNB1* mutado dando como resultado una señalización WNT constitutivamente activa y la expresión de S100A4. Aplicando el indicador del factor de transcripción LEF/TCF en el ensayo (TOP/FOPflash) se analizó la actividad de la vía WNT/CTNNB1 de las células HCT116 tratadas con niclosamida, así como sus células derivadas anuladas HAB-68mut y HAB-92wt que solo presentan el alelo mutado o el alelo tipo natural de *CTNNB1*, respectivamente. En ausencia de niclosamida, la actividad de la vía WNT aumentó 1,3 veces en las células HAB-68mut y disminuyó 2,9 veces en las células HAB-92wt en comparación con las células HCT116. La exposición a niclosamida dio como resultado una disminución de la actividad de la vía WNT en las células HCT116, HAB-68mut y HAB-92wt (HCT116 control vs niclosamida, media 1,00 vs 0,39, diferencia media 0,61, IC 95% 0,41 a 0,81,  $P < ,0001$ ; HAB-68mut control vs niclosamida, media 1,39 vs 0,50, diferencia media 0,90, IC 95% 0,64 a 1,16,  $P < ,0001$ ; HAB-92wt control vs niclosamida, media 0,36 vs 0,21, diferencia media 0,15, IC 95% CI 0,05 a 0,25,  $P = ,0077$ ) (Figura 6, A). El tratamiento con niclosamida también dio como resultado una disminución en la expresión del ARNm de S100A4 y de la proteína (HCT116 control vs niclosamida, media 1,00 vs 0,46, diferencia media 0,54, IC 95% 0,43 a 0,65,  $P < ,0001$ ; HAB-68mut control vs niclosamida, media 1,17 vs 0,62, diferencia media 0,55, IC 95% 0,41 a 0,69,  $P < ,0001$ ; HAB-92wt control vs niclosamida, media 0,03 vs 0,01, diferencia media 0,02, IC 95% CI -0,001 a 0,047,  $P = ,$  no estadísticamente significativa) (Figura 6, B). Por consiguiente, las tasas de migración de las células HCT116 y HAB-68mut se redujeron al nivel HAB-92wt tras el tratamiento con niclosamida (HCT116 control vs niclosamida, media 1,00 vs 0,45, diferencia media 0,54, IC 95% 0,22 a 0,87,  $P < ,0001$ ; HAB-68mut control vs niclosamida, media 1,30 vs 0,39, diferencia media 0,91, IC 95% 0,62 a 1,20,  $P < ,0001$ ; HAB-92wt control vs niclosamida, media 0,36 vs 0,32, diferencia media 0,04, IC 95% CI 0,08 a 0,16, no estadísticamente significativa) (Figura 6, C). En resumen, la niclosamida inhibe la transcripción del gen diana dependiente de la señalización WNT a pesar de una vía constitutivamente activa de WNT/CTNNB1.

#### **Ejemplo 8: Modo de acción de la niclosamida sobre el patrón WNT/CTNNB1**

La señalización activa de WNT es altamente dependiente de CTNNB1 nuclear. Por consiguiente, se analizó la cantidad de CTNNB1 nuclear bajo concentraciones crecientes de niclosamida. La exposición de las células HCT116 a concentraciones crecientes de niclosamida durante 18 horas no cambió el nivel de proteína del CTNNB1 nuclear (Figura 6, D). Sin embargo, no se observó una reducción en la señalización de WNT/CTNNB1 ni en la expresión del gen S100A4. Esto conduce a la hipótesis de que la niclosamida puede actuar dentro del núcleo para inhibir la formación del completo activador de la transcripción CTNNB1/TCF. Esta hipótesis se probó mediante EMSA, aplicando oligonucleótidos biotinilados que engloban el sitio de unión de TCF del promotor S100A4. Los cambios de los oligonucleótidos causados por la unión de TCF y CTNNB1/TCF se detectaron en ausencia de niclosamida (Figura 6, E), que es consistente con los resultados previos. La presencia de CTNNB1 dentro del complejo se comprobó mediante la formación del complejo con anti-CTNNB1 monoclonal lo que conduce a un superdesplazamiento. La exposición de las células HCT116 a unas concentraciones crecientes de niclosamida interrumpió el complejo CTNNB1/TCF/oligo de un modo concentración dependiente. No se ha podido detectar un superdesplazamiento en los extractos nucleares de células tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M. De acuerdo con estos resultados, el ensayo ChIP demostró que no se pudo amplificar por PCR la secuencia del promotor S100A4 después de la inmunoprecipitación de CTNNB1 de los extractos de células tratadas con niclosamida, pero se detectó un producto de PCR en los extractos de células tratados con solvente (Figura 6, F). Este último ya fue observado por Stein et al. No se pudo detectar ningún producto de PCR cuando se usó la inmunoglobulina G control para la precipitación o cuando la secuencia del promotor FOS se amplificó por PCR. En resumen, se concluyó que el tratamiento con niclosamida inhibe la formación del complejo CTNNB1/TCF y por ello inhibe la transcripción del gen diana WNT/CTNNB1.

**Ejemplo 9: Efecto de la niclosamida sobre la formación de metástasis in vivo**

Después, se monitorizó el efecto de la niclosamida en la formación de metástasis en ratones con xenotransplante mediante captura de imagen no invasiva in vivo por luminiscencia. El día 8 después de la transplatación intraesplénica de las células HCT116-CMVp-LUC, que expresan firefly luciferasa de forma estable, se formó un tumor de bazo visible en el ratón control tratado con solvente y en el ratón tratado con niclosamida a 20 mg por kg (Figura 7, A). La imagen lateral mostró que la señal del tumor de bazo aumentó en el ratón tratado con solvente y con niclosamida hasta alcanzar un máximo el día 24. Las diferencias en la localización de la señal se encontraron en la imagen ventral. En los ratones control se pudo detectar la señal de metástasis hepática lo cual fue confirmado por la captura de la imagen in situ y por aislamiento del hígado y del bazo. En los ratones tratados con niclosamida no se detectaron o solo se detectaron pequeñas metástasis hepáticas.

Niclosamida tuvo la capacidad de inhibir la expresión de S100A4 in vivo, ya que los niveles de ARNm de S100A4 se redujeron en los ratones tratados con niclosamida (control vs 2 x 15 mg por kg, media 100,0% vs 58,4%, diferencia media 41,7%, IC 95% 21,6% a 61,8%,  $P < .001$ ; control vs 20 mg por kg, media 100,0% vs 67,2%, diferencia media 32,9%, IC 95% 14,1% a 51,7%,  $P < .001$ ) (Figura 7, B). La clasificación de metástasis hepática disminuyó en los ratones tratados con niclosamida comparado con los ratones tratados con solvente (media control 100,0%, IC 95%-15,4% a 215,4%; 2 x 15 mg por kg media 36,1%, IC 95% 12,4% a 59,8%; 20 mg por kg media 3,9%, IC 95% 22,6% a 53,1%) (Figura 7, C). En resumen, se concluyó que el tratamiento con niclosamida inhibe la formación in vivo de metástasis inducida por S100A4.

**Ejemplo 10: Efecto a largo plazo del tratamiento con niclosamida in vitro e in vivo**

Después, se investigó el efecto de la formación de metástasis mediada por S100A4 cuando se interrumpe el tratamiento con niclosamida. Para abordar esto, las células HCT116 fueron tratadas diariamente con niclosamida durante tres días consecutivos. El día 4 se retiró la niclosamida. La expresión de S100A4 en estas células se mantuvo reprimida hasta aproximadamente el 50% del respectivo control tratado con solvente durante 24, 48 y 72 horas después de la interrupción de la exposición a niclosamida (control vs niclosamida 24 horas post-tratamiento, media 101,9% vs 58,0%, diferencia media 43,9%, IC 95% 31,0% a 56,8%,  $P = .0002$ ; control vs niclosamida 48 horas post-tratamiento, media 98,1% vs 44,4%, diferencia media 53,7%, IC 95% 33,2% a 74,1%,  $P = .0011$ ; control vs niclosamida 72 horas post-tratamiento, media 100,0% vs 57,9%, diferencia media 42,1%, IC 95% 16,6% a 67,6%,  $P = .0193$ ) (Figura 8, A). Además, la proteína S100A4 se redujo claramente durante tres días después de la interrupción del tratamiento con niclosamida. Las tasas de migración de células en estas células se mantuvieron reprimidas hasta menos del 30% del respectivo control tratado con solvente hasta tres días después de la eliminación de la niclosamida (control vs niclosamida 24 horas post-tratamiento, media 100,0% vs 18,7%, diferencia media 81,3%, IC 95% 40,7% a 122,0%,  $P = .0004$ ; control vs niclosamida 48 horas post-tratamiento, media 100,0% vs 12,2%, diferencia media 87,8%, IC 95% 54,9% a 120,7%,  $P < .0001$ ; control vs niclosamida 72 horas post-tratamiento, media 108,8% vs 10,4%, diferencia media 98,4%, IC 95% 41,5% a 155,4%,  $P = .0017$ ) (Figura 8, B).

La proliferación dependiente de anclaje de las células HCT116 tratadas con niclosamida se inhibió comparado con el control tratado con solvente (Figura 8, C). Después de cinco días, las células control tratadas con solvente alcanzaron el máximo. La retirada de la niclosamida en el día 5 no revertió la inhibición de la proliferación celular durante los cinco días siguientes cuando se comparó con las células tratadas de forma continua con niclosamida.

Además, se investigó la formación de metástasis in vivo bajo tratamiento continuo y discontinuo con niclosamida. La supervivencia total de los ratones tratados con niclosamida se alargó en comparación con los ratones tratados con solvente (control vs tratamiento discontinuo, supervivencia media 24 días vs 46,5 días, proporción 0,52, 95% CI 0,19 a 0,84,  $P = .0012$ ; control vs tratamiento continuo, supervivencia media 24 días vs 43 días; proporción 0,56, 95% CI 0,24 a 0,88,  $P = .0012$ ) (Figura 8 D). Además, no se observó ninguna diferencia en la supervivencia total en ratones en los que el tratamiento se interrumpió a los 24 días en comparación con los ratones bajo condiciones de tratamiento continuo con niclosamida.

En cada punto final individual de cada ratón, se extrajeron el hígado y el bazo y se aplicó la captura de imagen por luminiscencia in vivo. Todos los ratones desarrollaron un tumor de bazo. Sin embargo, el crecimiento del tumor en los ratones tratados con niclosamida, ya sea de forma continua como discontinua, fue claramente retrasado comparado con los ratones tratados con solvente (Figura 8, E). El tamaño de las metástasis hepáticas en los ratones tratados con niclosamida de forma continua o discontinua se redujo claramente comparado con los animales tratados con solvente. En los ratones tratados con niclosamida de forma discontinua, las metástasis hepáticas fueron ligeramente mayores que las de los ratones tratados con niclosamida de forma continua. Sin embargo, las señales de luminiscencia de las metástasis hepáticas de los animales control fueron más fuertes al día 29 que la señal de

metástasis hepáticas de los ratones tratados con niclosamida de forma continua o discontinua al día 50 lo que indica una inhibición a largo plazo de formación de la metástasis por la niclosamida.

La cuantificación del nivel de ARNm de S100A4 en el tejido tumoral del bazo reveló que en los ratones tratados con niclosamida el ARNm de S100A4 fue reprimido (control vs tratamiento discontinuo, media 100,0% vs 60%, diferencia media 40,0%, IC 95% 3,9% a 50,1%,  $P < ,001$ ; control vs tratamiento continuo, media 100,0% vs 73%, diferencia media 27%, IC 95% 15,8% a 64,2%,  $P < ,05$ ) (Figura 8, F). Además, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión de S100A4 en ratones con tratamiento continuo frente a discontinuo con niclosamida. De acuerdo con este resultado, la metástasis hepática se redujo en los ratones tratados con niclosamida comparado con los ratones control (control vs tratamiento discontinuo, media 100,0% vs 34,9%, diferencia media 65,1%, IC 95% 18,4% a 111,9%,  $P < ,01$ ; control vs tratamiento continuo, media 100,0% vs 10,9%, diferencia media 89,1%, IC 95% 45,3% a 133,0%,  $P < ,001$ ) (Figura 8, G). Además, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en ratones con tratamiento discontinuo frente a ratones con tratamiento continuo con niclosamida. En resumen, incluso cuando la niclosamida no se da de forma continua, la expresión de S100A4 y la formación de metástasis se inhibieron seriamente lo que conduce a una supervivencia global prolongada.

El uso de modelos animales en los ejemplos proporcionados anteriormente no es limitante para la presente invención cuyo uso previsto es la aplicación en sujetos humanos. El modelo de ratón representa un modelo normalizado aceptado para la aplicación en humanos y proporciona un soporte fiable para la aplicación en mamíferos, incluyendo preferentemente los humanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS USADOS EN LOS EJEMPLOS

### Líneas celulares y cultivos celulares

Las líneas celulares humanas de cáncer de colon SW620, LS174T, SW480, DLD-1 y HCT116 se hicieron crecer todas en medio RPMI-1640 (PAA Laboratories, Pasching, Austria) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Invitrogen). Las células HCT116 han sido descritas anteriormente como heterocigotas para la mutación deleción del codón 45 en uno de los dos alelos de *CTNNB1* que tiene como resultados la pérdida de una serina 45 que es el sitio de fosforilación inicial en la proteína beta-catenina (*CTNNB1*) necesario para la degradación proteosomal. Se usó la recombinación homóloga para deleccionar el alelo *CTNNB1* tipo natural que da como resultado el clon HAB-68mut. derivado de la célula HCT116 o para deleccionar el alelo d*CTNNB1*mutado que da como resultado el clon HAB-92wt derivado de la célula HCT116. Ambos clones de las células fueron amablemente suministrados por el Dr Todd Waldman (Georgetown University, Washington, Distrito de Columbia). Todas las células se expandieron brevemente en cultivo y se conservaron congeladas en varios viales replicados. Los bancos de células se probaron por PCR y por métodos de cultivo y se encontró que no contenían mycoplasma. Para autenticar las líneas celulares HAB-68mut y HAB-92wt como derivados de HCT116, se llevó a cabo un genotipado con repeticiones cortas en tándem (STR) el de agosto de 2010 usando el equipo identificador de ABI (Applied Biosystems). Los genotipos STR concordaban con los genotipos publicados para HCT116. Todas las células de mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>.

### Anticuerpos monoclonales y policlonales

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano-CTNNB1 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano tubulina- $\beta$ 1 (TUBB1) se adquirieron de BD Biosciences, Heidelberg, Alemania. El anticuerpo monoclonal contra el antígeno nuclear de proliferación celular humano (PCNA) se adquirió de Cell Signaling Technologies, Danvers, MA. El anticuerpo policlonal de conejo anti-S100A4 humano se adquirió de Dako, Glostrup, Dinamarca. El anticuerpo policlonal de cabra anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) humano y el anticuerpo anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Anti-conejo conjugado con HRP se adquirió de Promega Madison, WI. IgG anti-ratón conjugado con HRP y la IgM anti-ratón se adquirieron de Invitrogen.

### Transfección estable de células HCT116

Se amplificó por PCR la secuencia del promotor S100A4 (-1487 bp secuencia más arriba del sitio de inicio de la transcripción de S100A4) a partir de un vector suministrado amablemente por el Dr David Allard (Peninsula Medical School, Universities of Exeter y Plymouth, Exeter, UK) y se clonó en un vector pGL1.4 (Invitrogen) para conseguir que el gen de la luciferasa de luciérnaga (Firefly) (LUC) esté bajo el control del promotor S100A4 con un casete de resistencia a la neomicina. Este constructo se transfectó dentro las células HCT116 para obtener las células HCT116-S100A4p-LUC. Se clonó la secuencia ADNc de S100A4 a partir de un vector suministrado amablemente

por el Dr Claus Heizmann (Universidad de Zurich, Zurich, Suiza) en un vector pcDNA3.1 con un casete de resistencia a la puomicina. Este constructo se transfectó dentro las células HCT116 para obtener las células HCT116-S100A4 o el vector vacío para obtener las células HCT116-vector. Se clonó el gen indicador LUC bajo el control del promotor de CMV y se transfectó en las células HCT116 para obtener las células HCT116-CMVp-LUC.

- 5 Todos los constructos clonados se prepararon en nuestro laboratorio y se secuenciaron en una orientación estructural correcta. Todas las trasfecciones se realizaron con Metafectene (Biontex Laboratories, Munich, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Para obtener las células que expresan el transgen de forma estable se usaron para la selección mg por mL de neomicina (PAA Laboratories) o 1 µg por mL puomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA).

10

### Cribado de alto rendimiento

- Para el cribado de alto rendimiento se sembraron  $2,5 \times 10^3$  células por pocillo de las células HCT116-S100A4p-LUC en unas placas blancas opacas de 384 pocillos (Perkin Elmer, Waltham, MA) usando un sistema de pipeteado
- 15 automático BIOMEK 2000 (Beckman Coulter, Brea, CA). Los 1280 compuestos de la biblioteca de compuestos farmacológicamente activos (LOPAC 1280; obtenidos de Sigma-Aldrich, St Louis, MO) se disolvieron inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) y después se diluyeron en medio de cultivo RPMI-1640. Las muestras de los compuestos de prueba se añadieron entonces a las placas de ensayo que contienen las células que fueron tratadas durante 24 horas con cada uno de los compuestos a unas concentraciones de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM y 100 µM (un solo pocillo
- 20 por concentración). Después del compuesto de tratamiento, se determinó la expresión de la luciferasa usando un reactivo Britelite (Perkin Elmer) en un lector Wallac Victor (Perkin Elmer). En paralelo, se midió la citotoxicidad de los compuestos en unas placas de poliestireno transparente de 384 pocillos (Costar) por el ensayo de citotoxicidad azul de Alamar(Sigma-Aldrich). Después de 24 horas de tratamiento con el compuesto, el azul de Alamar diluido en un medio RPMI-1640 sin suero se añadió a cada pocillo y se continuó la incubación durante cuatro horas. Después las
- 25 lazas se leyeron en un lector rWallac Victor a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Tanto los datos de luminiscencia como los de fluorescencia del azul de Alamar, ocho pocillos con vehículos control se expresaron como media y los resultados del compuesto de ensayo (un solo pocillo) se expresaron como porcentaje del control. Las concentraciones eficaces para reducir la actividad de la luciferasa o de la fluorescencia del azul de Alamar en 50% se obtuvieron a partir de las curvas de concentración-respuesta por
- 30 interpolación lineal. La proporción entre el azul de Alamar vs luciferasa que representa la proporción de toxicidad vs actividad ( $\geq 2,0$ ) se usó para el triaje de los datos de cribado. Además, como cribado de selectividad, también se analizaron los compuestos inhibidores basándose en su capacidad para inhibir la expresión del indicador constitutivo de la luciferasa o dirigido por HIF-1α en líneas celulares de glioma U251 en un cribado de alto rendimiento previo de LOPAC. Los compuestos que muestran la mejor evidencia para la inhibición selectiva del indicador sin ser a causa
- 35 de su toxicidad fueron sometidos después a una prueba detallada de concentración-respuesta en ambos ensayos usando pocillos duplicados por concentración y diluciones dos veces 20 desde una concentración techo de 100 µM.

### Fármacos y tratamientos

- 40 Niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Los derivados de Niclosamida se obtuvieron de Drug Synthesis and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, NCI, Bethesda, MD. Todos los fármacos se solubilizaron en DMSO para la aplicación in vitro. La niclosamida in vivo se administró como suspensión al 10% de cremophor EL (BASF, Ludwigshafen, Alemania) y una solución de NaCl al 0,9%.

45

### Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR)

- Se aisló ARN total a partir de  $4 \times 10^5$  células sembradas en unas placas de 6 pocillos 24 horas antes de lisar las células con reactivo Trizol (Invitrogen). El ARN se extrajo con un reactivo de extracción de ARN Trizol (Invitrogen)
- 50 según las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARB se realizó con Nanodrop (Peglab) y 50 ng de ARN total fueron transcritos a la inversa con hexámeros aleatorios en MgCl<sub>2</sub> 10 mM; tampón 1x RT, 250 µM de mezcla dNTPs, 1 U por µL de inhibidor de la ARNasa y 2,5 U por µL MuLV de transcriptasa inversa (todos de Applied Biosystems). La reacción tuvo lugar a 42 °C durante 15 minutos, 99°C durante 5 minutos y posterior enfriamiento a 5°C durante 5 minutos. El producto de ADNc se amplificó en un volumen total de 10 µL en una placa de 96 pocillos
- 55 en un equipo LightCycler 480 (Roche) usando las condiciones siguientes: 95°C, 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 61 °C durante 30 segundos y 72°C durante 4 segundos. Para la cuantificación de ADNc de S100A4 se usaron los cebadores y sondas siguientes: cebador extremo 5'-CTCAGCGCTTCTTCTTTC-3', cebador inverso 5'-GGGTTCAGCAGCTCCTTTA-3', sonda fluoresceína isotiocianato 5'-TGTGATGGTGTCCACCTTCCACAAGT-3', sonda LCR640 5'-TCGGGCAAAGAGGGTGACAAGT -3'. Para la
- 60 cuantificación del ADNc de los genes consecutivos gluosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), se usó el Kit hG6PDH

de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El análisis de los datos se llevó a cabo con el software LightCycler® 480 versión 1.5.0 SP3. Para cada reacción de qRT-PCR se calculó la media de los duplicados. Cada valor medio del gen expresado se normalizó a la cantidad media respectiva de G6PD ADNc.

5

### **Inmunotransferencia**

- Para la extracción de proteína total, se lisaron las células con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1% , complementados con comprimidos inhibidores completos de proteasa; Roche) durante 30 minutos en
- 10 hielo. Para aislar la fracción de proteína nuclear, se usó el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction (Pierce) según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína se cuantificó usando el reactivo del ensayo de proteína con ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) según las instrucciones del fabricante y los lisados de igual concentración de proteína se separaron con SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Extra Hybond C (Amersham Biosciences). Las membranas se incubaron en una solución bloqueadora que contiene 5% de
- 15 leche en polvo desnatada y albúmina bovina sérica al 1% (DSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo de conejo anti-humano S100A4 (dilución, 1:1500), anticuerpo de ratón anti-humano -CTNNB1 (dilución, 1:1000), anticuerpo de ratón anti-humano TUBB1 (dilución, 1:1000), anticuerpo de cabra anti-humano GAPDH antibody (dilución, 1:500) o anticuerpo de ratón anti-humano PCNA (dilución, 1:1000) seguido de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-
- 20 cabra conjugado con HRP (dilución, 1:10000), anti-conejo (dilución, 1:10000), IgG anti ratón (dilución, 1:10000) o IgM anti-ratón (dilución, 1:10000). Los complejos anticuerpo-proteína se visualizan con un reactivo de luminiscencia electroquímica (ECL) (Tris-HCl 100mM, luminol 0,025% p/v, ácido para-hidroxycoumarico 0,011% p/v, dimetilsulfóxido 10% v/v, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,004% v/v, pH 8.6) y posterior exposición a CL-XPosure™ Films (Pierce) desde 1 segundo a 20 minutos. La inmunotransferencia para GAPDH y PCNA sirvió como control de carga de proteína. La
- 25 inmunotransferencia para β-tubulina sirvió para controlar que los extractos nucleares no contenían proteína citoplasmática. Todos los experimentos se realizaron por lo menos tres veces de forma independiente.

### **Ensayo de migración transpocillo en la cámara de Boyden y de invasión**

- 30 Las células HCT116, SW620, LS174T, SW480 y DLD-1 se usaron en los análisis de migración celular e invasión realizados con un ensayo en cámara de Boyden. 400 µL que contenían  $2,5 \times 10^5$  células se sembraron en una cámara transpocillo con filtro de membrana de tamaño de poro de 12,0 µm (Millipore, Schwalbach, Alemania). Para la invasión, las membranas de los filtros se recubrieron con 50 µL Matrigel (diluido 1:3 en RPMI-1640; BD Biosciences) 10 minutos antes de sembrar las células. Se añadió medio fresco (600 µL) en el fondo de la cámara y
- 35 se dejó que las células se engancharan a los recuadros durante 15 horas. Ambas cámaras fueron tratadas con niclosamida 1 µM niclosamida o la cantidad respectiva de DMSO y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado durante 24 horas. Después se extrajeron los recuadros y las células que habían migrado a través de la membrana a la cámara inferior se tripsinizaron y se contaron en una cámara de Neubauer (LO-Laboroptik, Bad Homburg, Alemania). Cada pocillo se contó diez veces. Cada experimento de migración o invasión
- 40 se llevó a cabo por duplicado. La media del número de células migradas o invadidas se determinó a partir de por lo menos tres experimentos independientes.

### **Ensayo de cierre de herida**

- 45 Para el ensayo de cierre de herida, se hicieron crecer las HCT116, SW620, LS174T, SW480 y DLD-1 para obtener un cultivo monocapa confluyente al 60% en el que se provocó una herida de aproximadamente 300 µm de ancho con una punta de pipeta estéril. El medio se cambió para eliminar las células no adherentes y la monocapa herida se trató con niclosamida 1 µM o la cantidad respectiva de DMSO cada 24 horas durante 4 días consecutivos. El progreso en el cierre de la herida se supervisa mediante unas micro-fotografías tomadas con un aumento de 10X de
- 50 un microscopio óptico Leica DM IL (Leica Microsystems) el día 0 y el día 4. El experimento de cierre de la herida se llevó a cabo tres veces de forma independiente.

### **Proliferación celular dependiente de anclaje**

- 55 Para la determinación de la proliferación celular, se sembraron  $2 \times 10^3$  células de HCT116, SW620, LS174T, SW480 y DLD-1 en una placa de 96 pocillos (una placa para cada día) y se dejaron 24 horas para que se engancharan en el fondo del pocillo. A partir de ese momento, las células se trataron cada día con niclosamida 1 µM o la cantidad respectiva de DMSO. Para la determinación de las células viables se añadió bromuro de 4,5-dimetil-2-tiazol-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT; Sigma) a una concentración final de 0,2 mg por mL y se incubaron durante 3 horas a 37°C
- 60 y 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado. MTT se redujo para formar cristales de formazan púrpura por parte de

las mitocondrias de las células vivas y el aumento del MTT metabolizado reflejó un aumento en el número de células. El MTT recristalizado se disolvió de nuevo con SDS al 10% en HCl 10 mM y la absorción se midió a 560 nm. Las mediciones de MTT se realizaron diariamente durante 5 días consecutivos. La metabolización media de MTT se determinó a partir de dos experimentos independientes realizado cada uno de ellos por triplicado.

5

#### **Ensayo de formación de colonias**

El análisis de proliferación celular independiente de anclaje se consiguió mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando. Una capa del fondo que contiene 0,5% p/v de agarosa, medio RPMI-1640, FBS 10% y niclosamida 1  $\mu$ M o la cantidad respectiva de DMSO se añadió a una placa de 6 cm Ø y se incubó a temperatura ambiente bajo unas condiciones estériles durante 10 minutos. Sobre la capa del fondo solidificada se añadió una capa superior que contiene  $8 \times 10^3$  células, 0,33% p/v agarosa, medio RPMI-1640, 10% FBS y niclosamida 1  $\mu$ M o la cantidad respectiva de DMSO. Las células se sembraron como células únicas en el agar blando y se incubaron en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días. La formación de colonias se visualizó mediante un aumento de 10X para una visión general y un aumento de 40X para las colonias únicas en un microscopio óptico Leica DM IL (Leica Microsystems). La cuantificación de células se consiguió mediante el recuento de las colonias de células de más de 4 células en 10 cuadrados de 1  $\mu$ m<sup>2</sup>. Los experimentos de formación de colonias se repitieron dos veces, cada una por triplicado.

#### **20 Ensayo del patrón de actividad del marcador WNT/CTNNB1**

En ensayo indicador la actividad del factor 1 de unión potenciador linfóide (LEF)/ factor de transcripción (TCF), también conocido como ensayo TOP/FOPflash (Promega, Madison, WI) se usó previamente para analizar la actividad de la vía WNT/CTNNB1 en las células humanas de cáncer de colon. Comprende el plásmido TOPflash que contiene una repetición hexamérica del elemento de unión LEF/TCF hacia arriba de un promotor de la timidina kinasa y firefly luciferasa como gen indicador. El plásmido FOPflash comprende la secuencia exacta del plásmido FOPflash, pero con unos puntos mutados en los sitios de unión LEF/TCF. En el ensayo, se sembraron  $8 \times 10^4$  células HCT116 en unas placas de 24 pocillos y se dejaron 24 horas para que se enganchen al fondo del pocillo. Las células se transfirieron con plásmidos TOPflash o FOPflash usando Metafecten según las instrucciones del fabricante 24 horas antes de que fueran tratados con niclosamida 1  $\mu$ M o la cantidad respectiva de DMSO durante otras 24 horas. La actividad de la luciferasa como lectura de la actividad de LEF/TCF y de este modo de la actividad de la vía WNT/CTNNB1 se midió a través de un sistema de ensayo de luciferasa Steady Glow™ (Promega) según las instrucciones del fabricante 24 horas en el lector de luminiscencia SpectraFluor Plus (Tecan) con un tiempo de exposición de 1500 milisegundos y una captura de 150. La expresión del gen indicador TOPflash (que representa la actividad de la vía WNT) se normalizó hasta la expresión del gen indicador FOPflash (que representa la expresión basal del gen indicador y la eficiencia de la transfección). Se proporciona aquí la media de tres experimentos independientes, aunque cada experimento se realizó por duplicado.

#### **Ensayo de cambio de movilidad electroforética**

40

El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se realizó tal como se ha descrito anteriormente. Se sembraron  $5 \times 10^6$  células HCT116 en una placa de cultivo de 10 cm y se dejaron 15 horas para que se enganchen en el fondo de la placa. Las células se trataron con niclosamida 0,1; 0,3; 0,6 o 1  $\mu$ M o la cantidad respectiva de DMSO durante 24 horas. Para cada condición, 5  $\mu$ g de proteína nuclear extraída se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 0,05% p/v poli dI•dC, Tris 0,5 mM, EDTA 0,05 mM, 2,5% p/v glicerol, 0,2% v/v NP-40, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y oligonucleótidos biotinilados de doble hebra (sentido 5'-CCGGGCATGGGGATCCCCACCCAGTTTTTGTCTGAATCTTTATTTTTTAAAGAGACA-3', antisentido 3'-GGCCCGTACCCCTAGGGGTGGGGTCAAAAACAAAGACTTAGAAATAAAAAAATTCTCTG T-5') que comprende el sitio de unión TCF del promotor S100A4. Para el superdesplazamiento se añadieron 1,25  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal CTNNB1 (BD Biosciences). La separación por electroforesis de los complejos proteína-oligonucleótido se realizaron en geles pre-cast Novex 6% TBE (Invitrogen) y en tampón TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) durante 60 minutos a 100 V. LA transferencia capilar de los complejos proteína-oligonucleótidos a la membrana de nailon Hybond™-N (Amersham Biosciences) se produjo en tampón SSC 20x (NaCl 3M, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 300 mM, pH 7) durante toda la noche. El entrecruzamiento del ADN transferido a la membrana se produjo a 250 mJ por cm<sup>2</sup> durante 1 minuto en el FL-20-M FluoLink Crosslinker (Bachofer). La visualización del ADN marcado con biotina se realizó con un kit LightShift Chemiluminescent EMSA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Se muestra aquí un representativo de por lo menos dos experimentos independientes.

#### **60 Inmunoprecipitación de la cromatina**

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se ha descrito anteriormente para determinar la unión de CTNNB1 al promotor S100A4. Para la preparación de los lisados de las células se sembraron  $1 \times 10^6$  células HCT116 en una placa de 10 cm Ø 15 horas antes se trataron con niclosamida  $1 \mu\text{M}$  o la cantidad respectiva de DMSO durante 24 horas. Las células se incubaron con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar el entrecruzamiento reversible de las proteínas y el ADN. Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo y se lisaron el tampón de lisis A (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH8) durante 10 minutos en hielo. Los lisados de las células se sonicaron durante 20 pulsaciones al 40% de potencia y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y un tercio del sobrenadante diluido se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  y sirvió al final como un control de partida. Para la inmunoprecipitación el sobrenadante diluido se incubó  $5 \mu\text{g}$  de anticuerpo monoclonal CTNNB1 o  $5 \mu\text{g}$  de IgG control (ambos de BD Biosciences) durante la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Se añadieron unas bolas de Proteína G (Invitrogen) y se incubaron durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ . La proteína no unida se lavó dos veces con tampón de lavado A (10 mM Tris, 0.1 % SDS, 0.1 % Nadesoxicolato, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 140 mM NaCl, pH 8), una vez con tampón de lavado B (tampón de lavado A, 6% p/v NaCl) y dos veces con tampón TE (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). La elución del complejo proteína-ADN de las bolas se produjo por incubación con solución SDS al 1,5% p/v durante 15 minutos a temperatura ambiente seguida de centrifugación a 3000 rpm durante 1 minuto. Para asegurar la elución completa se lleva a cabo una segunda elución de las bolas en una solución SDS al 0,5% durante 15 minutos a temperatura ambiente seguida de centrifugación a 3000 rpm durante 1 minuto. El entrecruzamiento se revertió a  $68^\circ\text{C}$  durante 4 horas y la proteína residual se digirió con la proteinasa K (Fermentas, St.Leon-Rot, Alemania) a  $55^\circ\text{C}$  durante 2 horas. El ADN se purificó por precipitación y se llevó a cabo la amplificación por PCR del sitio de unión TCF del promotor S100A4 (cebador hacia delante 5'-TGTTCCCTCCAGATCCC-3'; cebador inverso 5'-GGCTATGCTCAAGCCACTG-3'). La amplificación por PCR de la secuencia del promotor (FOS) homólogo del oncogen viral de osteosarcoma viral murino FBJ no regulado por CTNNB1 (cebador hacia delante 5'-CCTTAATATTTCCACACATGGC-3', cebador inverso 5'-CTGCGTTTGAAGCAGAAAGT-3') sirvió como control. Los amplicones esperados para S100A4 y FOS tuvieron un tamaño de 167- o 149 bp, respectivamente. ChIP se realizó en dos experimentos independientes.

#### Captura de imagen in vivo por luminiscencia de la formación de la metástasis

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de UKCCCR y fueron aprobados por las autoridades locales (Ministerio de salud y asuntos sociales, Berlín, Alemania). Las células HCT116-CMVp-LUC ( $3 \times 10^6$  células por ratón, resuspendidas en  $50 \mu\text{L}$  de PBS) se trasplantaron intraesplénicamente en ratones hebras con diabetes severa no obesas combinado con inmunodeficiencia (NOD-SCID) de 6 semanas de vida. Los ratones se asignaron aleatoriamente a 3 grupos y el tratamiento de los ratones se inició 24 horas después del trasplante de las células. Los ratones del grupo control ( $n=9$ ) fueron tratados con dosis diarias del solvente. Los ratones del segundo grupo ( $n=9$ ) fueron tratados diariamente por vía intraperitoneal con 20 mg por kg de niclosamida. Los ratones del tercer grupo ( $n=9$ ) fueron tratados por vía intraperitoneal con dos dosis de 15 mg por kg de niclosamida por día. Los puntos finales de los experimentos se alcanzaron cuando el ratón parecía moribundo y/o cuando el tumor del bazo era palpable. Esto es lo que pasaba con la mayoría de los ratones control el día 24. Para los experimentos in vivo a largo plazo, los ratones se asignaron aleatoriamente a 3 grupos. Los ratones del grupo control ( $n=6$ ) fueron tratados intraperitonealmente con dosis diarias del solvente. Los ratones del segundo grupo ( $n=6$ ) fueron tratados diariamente por vía intraperitoneal con 20 mg por kg de niclosamida. Los ratones del tercer grupo ( $n=6$ ) fueron tratados diariamente por vía intraperitoneal durante 24 días con 20 mg por kg de niclosamida y los días restantes con solvente. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical cuando el tumor alcanzó el tamaño máximo de acuerdo con las autoridades locales.

Se extrajeron el bazo (como sitio de trasplante) y el hígado (como órgano diana de la metástasis). La cantidad de ARNm de S100A4 en el tumor se determinó mediante aislamiento de ARN TRIzol de las crio-secciones del tumor y mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. El nivel de metástasis se evaluó por puntuación. Para cada hígado, se calculó una puntuación como la suma de los volúmenes de las metástasis individuales. Para cada metástasis se aplicó la fórmula  $[\text{ancho}^2] \times \text{longitud}$ .

Para la captura de las imágenes in vivo por luminiscencia se anestesiaron con 35 mg por kg de Hypnomidate (Jassen-Cilag, Neuss, Alemania) y recibieron por vía intraperitoneal 150 mg por kg de D-luciferina (Biosynth, Staad, Suiza) disuelta en PBS estéril. La captura de la imagen se llevó a cabo con un sistema NightOWL LB 981 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) con unos tiempos de exposición de 1 segundo a 20 segundos. Se usó la ImageJ version 2.3 para la codificación de color de la intensidad de la señal (que presenta una escala de grises de 256) y las fotos en capas.

#### 60 Análisis estadístico

Todos los cálculos se realizaron con GraphPad Prism version 4.01. Se usó la prueba de Student para la comparación de solo dos grupos. Se amplió a un análisis de la varianza de dos colas y una vía para la comparación del grupo control con varios grupos tratados seguido por la comparación múltiple post hoc de Bonferroni. En los ensayos de citotoxicidad los valores de la concentración máxima efectiva a la que la viabilidad celular se reduce al 50% (EC50) se calcularon mediante la curva sigmoidal de dosis respuesta de  $x = \log(x)$  datos transformados. Se usó un análisis de Kaplan Meier para representar la supervivencia global y las diferencias entre las curvas se analizaron por la prueba de Logrank. Todas las pruebas fueron de dos colas, y los valores P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Si no se indica de otra forma, las medias se describen con un intervalo de confianza del 95%.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.  
Identificación de la niclosamida mediante cribado de alto rendimiento
- Figura 2.  
Efecto de la niclosamida sobre ARNm y la expresión celular de S100A4 en las células humanas de cáncer de colon
- Figura 3.  
Efecto de la niclosamida sobre la motilidad y la proliferación celular
- Figura 4.  
Efecto de la niclosamida sobre las células de cáncer de colon SW620, LS174T, SW480 y DLD-1.
- Figura 5.  
Efecto de la niclosamida y sus derivados sobre la expresión de S100A4 y la movilidad celular inducida por S100A4.
- Figura 6.  
Efecto de la niclosamida sobre la señalización WNT/CTNNB1 constitutivamente activa
- Figura 7.  
Monitorización de la luminiscencia in vivo del efecto de la niclosamida sobre la metástasis en un xenoimplante en ratón
- Figura 8.  
Efectos a largo plazo del tratamiento con niclosamida in vitro e in vivo

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

### Figura 1 Identificación de la niclosamida mediante cribado de alto rendimiento.

(A) Representación esquemática del sistema marcador aplicado al cribado de alto rendimiento. La secuencia que comprende el promotor S100A4 de 1487 pb más arriba del sitio de inicio de la transcripción de S100A4 controló la expresión del marcador luciferasa de luciérnaga (Firefly) (LUC). El constructo fue expresado de forma estable por las células HCT116-S100A4p-LUC que se expusieron más a compuestos de la biblioteca de compuestos farmacológicamente activos (LOPAC) 1280. Tal como se ha descrito se determinó la actividad de la luciferasa y la viabilidad de las células. (B) Resumen esquemático del cribado de alto rendimiento. (C) Cribado de nuevo de 20-concentraciones de niclosamida en las células HCT116-S100A4p-LUC. Las células fueron expuestas a 20 diluciones dobles de niclosamida en unos pocillos duplicados por dilución durante 24 horas. Se determinó la actividad de la luciferasa y la viabilidad de las células. Las barras de error representan la desviación estándar para los dos pocillos duplicado en cada dilución.

### Figura 2 Efecto de la niclosamida sobre ARNm y la expresión celular de S100A4 en las células humanas de cáncer de colon.

(A) Determinación de la citotoxicidad de niclosamida sobre las células HCT116. Las células se trataron con unas concentraciones crecientes de niclosamida durante 24 horas y se calculó la viabilidad celular. (B) Efecto de concentraciones crecientes de niclosamida sobre la expresión de S100A4. Las células HCT116 fueron tratadas con unas concentraciones crecientes de niclosamida durante 24 horas. La expresión de S100A4 se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) e Inmunotransferencia. (C) Dependencia del tiempo del efecto de la niclosamida sobre la expresión de S100A4. Las células HCT116 se trataron con una dosis única de niclosamida 1μM durante 24 horas y se analizó la expresión de S100A4 por qRT-PCR e inmunotransferencia en los puntos de tiempo indicados. Las líneas negras indican las condiciones de tratamiento seleccionadas para otros experimentos. (D) Efecto

de las dosis diarias de niclosamida sobre la expresión de S100A4. Las células HTC116 se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M y se analizó la expresión de S100A4 por qRT-PCR e inmunotransferencia. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS ( $n > 2$ ). Las diferencias en los grupos tratados se compararon con el grupo control mediante un análisis de varianza de dos colas una vía y una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni.

(E) Efecto de niclosamida en las células HTC116-vector y HTC116-S100A4. Las células HTC116-vector y HTC116-S100A4 son tratados con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas y se analizó la expresión de S100A4 por qRT-PCR e inmunotransferencia. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS ( $n > 2$ ). La comparación de niclosamida vs células tratadas con solvente se analizó con una prueba t de Student.

### Figura 3 Efecto de la niclosamida sobre la motilidad y la proliferación celular.

(A) Migración celular de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 expuestas al tratamiento con niclosamida. Las células fueron tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas y las tasas de migración se midieron mediante el ensayo de la cámara de Boyden. (B) Invasión celular de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 expuestas al tratamiento con niclosamida. Las células fueron tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas y la invasión celular se determinó mediante el ensayo de la cámara de Boyden. (D) Migración dirigida de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 expuestas al tratamiento con niclosamida y analizada por el ensayo de cierre de herida. Las heridas de 300  $\mu$ M de ancho se colocaron en monocapa confluyente al 60% de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 en el día 1. Las células se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M durante 4 días. Las microfotografías del día 4 se presentan en la presente memoria como líneas negras que indican los márgenes de una herida introducida del día 1; las barras de escala representan 200  $\mu$ M. Los datos representan tres experimentos independientes. (D) Proliferación celular adhesiva de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 expuestas al tratamiento con niclosamida. Las células se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M y la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. (B) Crecimiento celular independiente de anclaje de las células HCT116-vector y HCT116-S100A4 expuestas al tratamiento con niclosamida. Las células se sembraron como células únicas en agarosa al 0,33% (p/v) y tratamiento (solvente o niclosamida 1  $\mu$ M) que contiene medio. Después de 7 días las células se observaron a microscopio óptico a 10 X (visión general) y a un aumento 40X (una sola colonia). (F) Cuantificación de células formadas. Número de colonias (de más de 4 células) se contaron y se normalizaron con las células HCT116-vector tratadas con solvente. Las diferencias entre niclosamida vs células tratadas con solvente se analizaron con una prueba t de Student. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS ( $n > 2$ ) de por lo menos dos experimentos independientes realizado cada uno por lo menos por duplicado.

### Figura 4 Efecto de la niclosamida sobre las células de cáncer de colon SW620, LS174T, SW480 y DLD-1.

(A) Expresión de S100A4 bajo tratamiento con niclosamida. Las células se trataron con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas. La expresión de S100A4 se analizó con qRT-PCR e inmunotransferencia (A) Migración celular bajo el tratamiento con niclosamida. Las tasas de migración de las células tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas se determinaron en el ensayo de la cámara de Boyden y los valores se normalizaron para las células SW620 tratadas con solvente. (A) Invasión celular bajo el tratamiento con niclosamida. Las células fueron sembradas en trans-pocillos cubiertos por Matrigel y tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas. Las células invadieron la cámara inferior donde se contaron y normalizaron a las células SW620 tratadas con solvente. Las diferencias entre solvente vs células tratadas con Niclosamida se analizaron con una prueba t de Student. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS de por lo menos dos experimentos independientes realizado cada uno por triplicado. (A) Migración dirigida bajo el tratamiento con niclosamida. Las heridas de 300  $\mu$ M de ancho se colocaron en monocapa confluyente al 60% de las células en el día 1. Las células se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M durante 4 días. Las microfotografías del día 4 se presentan en la presente memoria como líneas negras que indican los márgenes de una herida del día 1; las barras de escala representan 200  $\mu$ M. Los datos de migración dirigida que se muestran son representativos de tres experimentos independientes. (E) Proliferación celular adhesiva bajo el tratamiento con niclosamida. Las células se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M. La cantidad de células viables por pocillo se determina mediante el ensayo MTT. Crecimiento celular independiente de anclaje bajo tratamiento con niclosamida. Las células se sembraron como células únicas en agarosa al 0,33% (p/v) y tratamiento (solvente o niclosamida 1  $\mu$ M) que contiene medio. Después de 7 días las células se observaron a microscopio óptico a 10 X (visión general) y a un aumento 40X (una sola colonia). (FG) Cuantificación de células formadas. Número de colonias (de más de 4 células) se contaron y se normalizaron con las células SW620 tratadas con solvente. Las diferencias entre solvente vs células tratadas con Niclosamida se analizaron con una prueba t de Student. Los datos se presentan como media  $\pm$

DS de por lo menos dos experimentos independientes realizado cada uno por duplicado.

**Figura 5 ·Efecto de la niclosamida y sus derivados sobre la expresión de S100A4 y la movilidad celular inducida por S100A4.**

(A) Estructura química de la niclosamida y sus derivados. En las ilustraciones 2D la estructura de la niclosamida se comparó con la estructura de los derivados de la niclosamida, marcado en círculos rellenos o cajas se añaden los grupos químicos, marcado en gris o en líneas discontinuas se eliminan los grupos químicos. En las ilustraciones en 3D las nubes grises representan una superficie de van der Waals, el rojo y el azul indican cargas negativas y positivas, respectivamente. (B) Expresión de S100A4 bajo condiciones tratadas. Las células HTC116 fueron tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M o con uno de los derivados de la niclosamida durante 24 horas. La expresión de S100A4 se analizó por qRT-PCR e inmunotransferencia (C) Migración celular bajo condiciones tratadas. Las células HTC116 fueron tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M o uno de sus derivados durante 24 horas y la invasión celular se determinó mediante el ensayo de la cámara de Boyden. Las células migaron a la cámara inferior donde se contaron y normalizaron al número de células HTC116 tratadas con solvente migradas. La comparación de células tratadas con niclosamida o derivado vs células tratadas con solvente se realizó mediante un análisis de varianza de dos colas una vía y una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS de por lo menos cuatro experimentos independientes realizado cada uno por duplicado.

**Figura 6 Efecto de la niclosamida sobre la señalización WNT/CTNNB1 constitutivamente activa.**

Para el análisis de la vía de WNT se aplicaron las células siguientes: Células HTC116 (heterocigotas para la obtención de la función de CTNNB1 mutado; wt/mut), células HAB-68mut (delección mutante de HTC116, que solo expresa la obtención de la función mutada de CTNNB1: -/mut) y las células HAB-92wt (delección mutante de HTC116, que solo expresa el tipo natural de CTNNB1: wt/-). (A) Efecto genotipo dependiente de CTNNB1 de niclosamida sobre la expresión del gen indicador del factor de transcripción LEF/TCF. Las células se trataron con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas. La expresión del gen indicador se determinó a través de la medición de la actividad de la luciferasa. Para cada condición y línea celular la expresión de TOPflash se normalizó a la expresión de FOPflash. (B) Efecto genotipo CTNNB1 dependiente de niclosamida sobre la expresión de S100A4. Las células se trataron con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas. La expresión de S100A4 se analizó por qRT-PCR e inmunotransferencia (B) Efecto genotipo CTNNB1 dependiente de niclosamida sobre las tasas de migración. Las células fueron tratadas con niclosamida 1  $\mu$ M durante 24 horas y la migración celular se determinó mediante el ensayo de la cámara de Boyden. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS de por lo menos tres experimentos independientes. Las diferencias se analizaron mediante la prueba T de Student (n.s, no estadísticamente significativo). (D) Localización nuclear de CTNNB1 bajo el tratamiento con niclosamida. Los extractos nucleares de las células HTC116 tratadas con las concentraciones indicadas de niclosamida durante 18 horas se analizaron por inmunotransferencia. (E) Efecto de niclosamida sobre el complejo CTNNB1/TCF. Los extractos nucleares de las células HTC116 tratadas con las concentraciones indicadas de niclosamida durante 18 horas se analizaron por EMSA para el sitio de unión TCF del promotor S100A4. Los superdesplazamientos se realizaron por la adición del anticuerpo monoclonal anti-CTNNB1. (F) Presencia de CTNNB1 en el promotor S100A4 bajo tratamiento con niclosamida. Las células HTC116 se trataron con niclosamida 1  $\mu$ M durante 18 horas y se procesaron por el ensayo ChIP. La cromatina soluble se inmunoprecipitó con un anticuerpo monoclonal anti-CTNNB1 o un anticuerpo IgG control no específico. Los cebadores usados en la PCR amplificaron un fragmento de 167 pb del promotor S100A4 o un fragmento de 149 pb del promotor FOS. La corriente verificó la integridad de la PCR. La secuencia del promotor FOS a la que no se une CTNNB1 se usó como control. Los datos son representativos de por lo menos dos experimentos independientes.

**Figura 7 Monitorización de la luminiscencia in vivo del efecto de la niclosamida sobre la metástasis en un xenotransplante en ratón.**

(A) Captura de imagen de luminiscencia in vivo de la metástasis bajo tratamiento con niclosamida. Las células HTC116-CMVp-LUC que expresan la luciferasa de luciérnaga (Firefly) (LUC) se trasplantaron intraesplenicamente en ratones (n=4 por grupo) seguido de un tratamiento intraperitoneal diaria con 20 mg por kg de niclosamida. Para la captura de imágenes de luminiscencia, los ratones se anestesiaron los días indicados y se les administró intraperitonealmente D-luciferina. El tiempo de exposición para la captura de las imágenes lateral y ventral fue de 20 segundos por imagen. La captura de imagen in situ y de órganos aislados se realizó durante 1 segundo por tiempo de exposición por imagen. La intensidad de la señal de las escalas de grises de las fotos (escala 256) se codificaron (desde la intensidad más baja a la mayor: azul, verde, amarillo, rojo, blanco) y se sobrepuso con el brillo del campo. (B) Nivel del ARNm de S100A4A

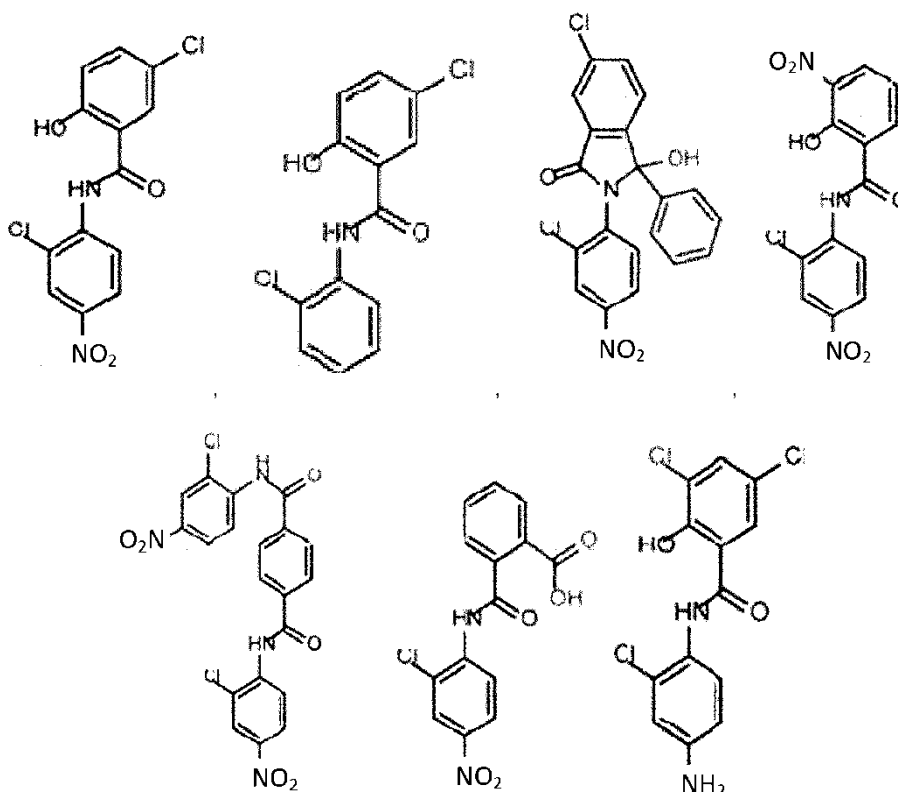
en el tumor de bazo de ratones con xenotransplante tratados con niclosamida. Se diseccionaron los bazo de ratones (n=9 por grupo) el día 24. El tejido del tumor se crioseccionó para el aislamiento del ARN. El nivel de ARN de S100A4 se midió por qRT-PCR y se expresó como porcentaje del ratón control. Las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza de dos colas una vía y una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. Las barras representan media  $\pm$  DS. (C) Tamaño de las metástasis hepáticas en ratones con xenoinplantos tratados con niclosamida. Se diseccionó el hígado de los ratones con xenotransplante (n=9 por grupo) tratados intraperitonealmente dos veces al día con 15 mg por kg o diariamente con 20 mg por kg niclosamida durante 24 días. La metástasis se cuantificó por puntuación. Los datos se presentan como media  $\pm$  DS.

**Figura 8 Efectos a largo plazo del tratamiento con niclosamida in vitro e in vivo.**

(A) Expresión de S100A4 in vitro después de interrumpir el tratamiento con niclosamida. Las células HCT116 se trataron diariamente con niclosamida 1  $\mu$ M durante tres días consecutivos, se eliminó el medio el día 4, y se analizó la expresión de S100A4 24, 48 y 72 horas después de retirar la niclosamida. La expresión de S100A4 se analizó por qRT-PCR e inmunotransferencia. (B) Migración celular después de interrumpir el tratamiento con niclosamida. Las tasas de migración de las células HCT116 tratadas como se describe en (A) se determinaron mediante el ensayo de la cámara de Boyden. Las diferencias entre control y células tratadas se analizaron con una prueba t de Student. (C) Proliferación celular dependiente de anclaje después de interrumpir el tratamiento con niclosamida. Las células HCT116 se trataron con niclosamida 1  $\mu$ M o solvente diariamente o niclosamida durante los primeros cinco días y solvente a partir del día 5 (la flecha indica la interrupción del tratamiento). La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. (D) Supervivencia global de los ratones tratados de forma continuada y discontinua con niclosamida. Las células HCT116-CMVp-LUC se inyectaron intraesplénicamente en los ratones (n=6 por grupo). Los ratones fueron tratados diariamente intraperitonealmente ya sea con solvente o 20 mg por kg de niclosamida o durante los primeros 24 días con 20 mg por Kg de niclosamida seguido de solvente. La comparación de las curvas de supervivencia se realizó con una prueba de logrank: (E) Señal de luminiscencia de las metástasis hepáticas y de tumores del bazo. Los ratones fueron inyectados con D-luciferina 10 minutos antes se habían diseccionado el hígado y el bazo y se había obtenido una imagen durante 1 segundo de exposición. La intensidad de la señal de las escalas de grises de las fotos (escala 256) se codificó por colores siendo el blanco la mayor intensidad. (F) Expresión de ARNm de S100A4 en los tumores de bazo. El tejido del tumor se crioseccionó para el aislamiento del ARN. El nivel de ARN de S100A4 se midió por qRT-PCR y se expresó como porcentaje de los animales control. (G) Tamaño de las metástasis hepáticas en ratones tratados de forma continuada o discontinua con niclosamida. Las metástasis hepáticas en los hígados diseccionados se cuantificaron por puntuación. Las barras representan media  $\pm$  DS. Las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza de dos colas una vía y una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni.

# REIVINDICACIONES

1. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento para la inhibición y/ reducción de la diseminación del cáncer metastásico, en el que dicha niclosamida o su derivado se selecciona de entre el grupo que  
5 consiste en



- 10 o compuestos en los que están presentes otros halógenos en las posiciones ocupadas por Cl en dicha niclosamida o sus derivados.

2. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según la reivindicación 1, que comprende  
15 la inhibición y/o reducción de la migración e invasión de las células cancerosas.

3. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según la reivindicación 1 o 2 para la inhibición y/o reducción de la migración e invasión celular dirigida por S100A4.

- 20 4. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según las reivindicaciones 1 a 3., en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que comprende cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, melanoma, piel, cáncer de páncreas, cáncer relacionado con S100A4 u otro cáncer todavía por determinar en el que los niveles de S100A4 están elevados, sobreexpresados, mutados o alterados en su fisiología cuando se compara con las células no  
25 oncogénicas.

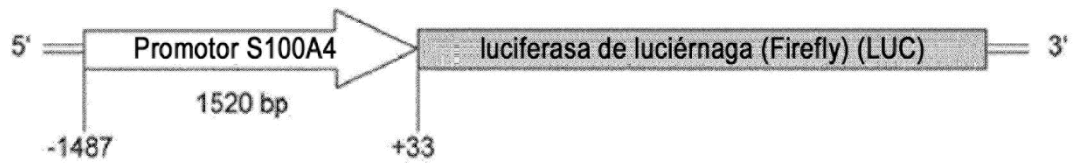
5. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según por lo menos uno de las reivindicaciones anteriores, en la que la niclosamida o sus derivados modulan el complejo TCF/proteína beta-catenina.

- 30 6. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha modulación tiene como resultado una disminución en el nivel de transcripción de S100A4.

7. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en la que el paciente o grupo de pacientes a tratar se identifica mediante la expresión aumentada de S100A4.
- 5 8. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según la reivindicación anterior, en la que el fluido corporal y/o tejido de un paciente a identificar se analiza para determinar los niveles de expresión de S100A4.
9. Niclosamida o su derivado para el uso como medicamento según por lo menos una de las
- 10 reivindicaciones anteriores, en la que la reducción de la propagación de las células metastásicas se produce además por medio de moléculas de ácido nucleico, preferentemente a través de ácidos nucleicos con complementariedad con el ARNm de los componentes de la vía Wnt.
10. Composición farmacéutica que comprende niclosamida o su derivado según una de las
- 15 reivindicaciones anteriores para el uso como medicamento para la inhibición y/o reducción de la propagación del cáncer metastásico.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 que comprende por lo menos niclosamida o su derivado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicha composición es una cápsula, un
- 20 comprimido, un comprimido recubierto, un supositorio, un ungüento, una crema, una solución para inyección y/o una solución para infusión.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 u 11, en la que la composición comprende niclosamida o su derivado y uno o más fármacos quimioterapéuticos.
- 25 13. Niclosamida para el uso como medicamento según una de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento de la metástasis de cáncer.
14. Niclosamida para el uso como medicamento según una de las reivindicaciones anteriores para la
- 30 prevención de formación de la metástasis en el cáncer.

Fig. 1

**A**



**B**

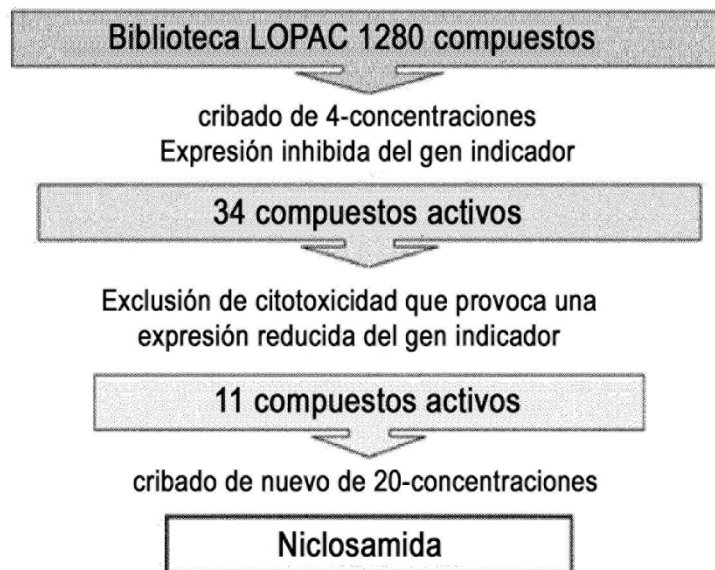


Fig. 1 (cont)

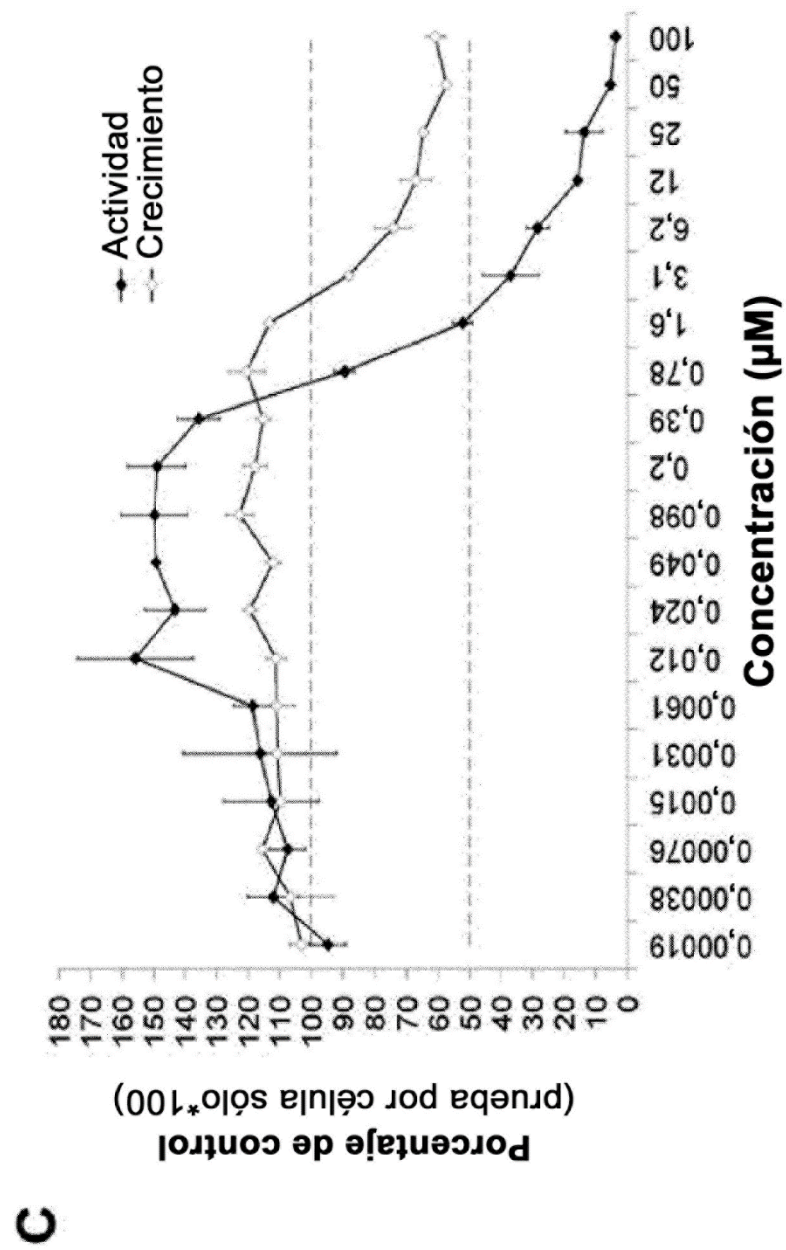


Fig. 2

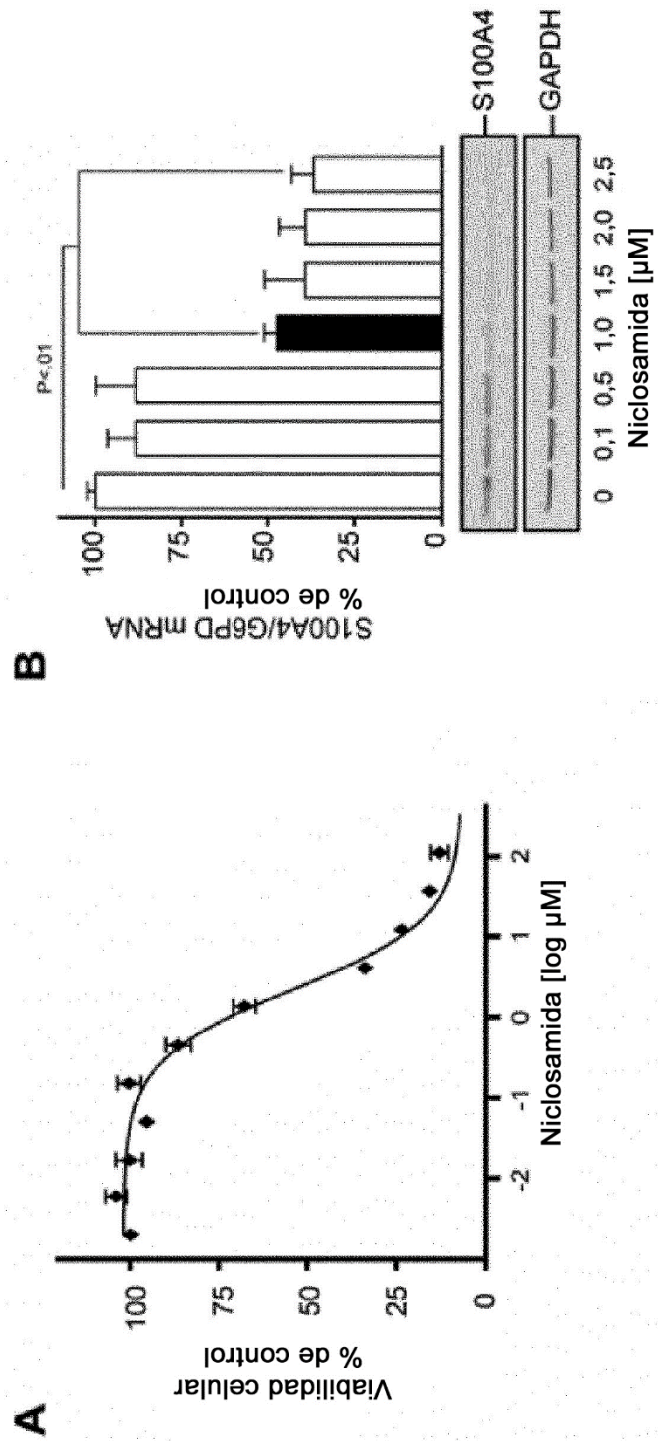


Fig. 2 (cont)

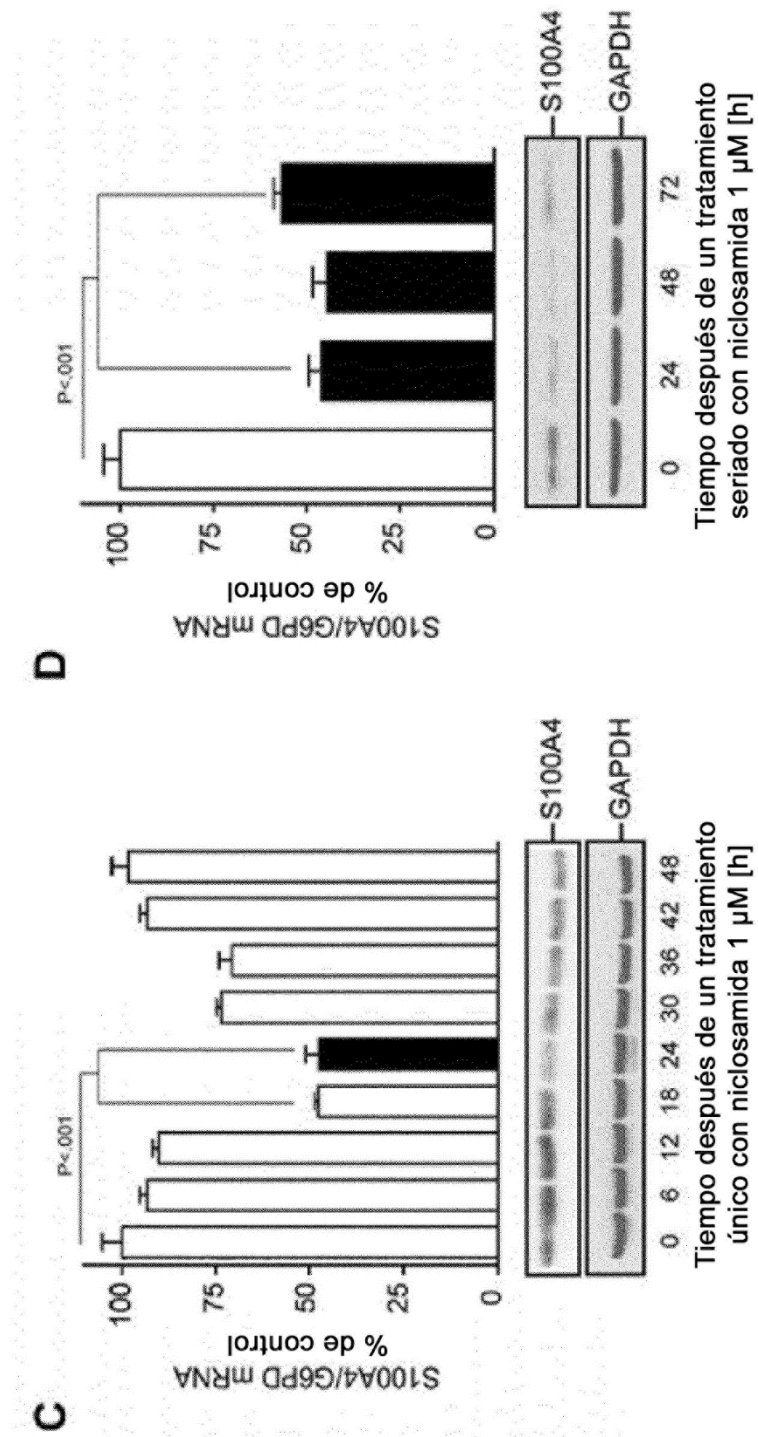


Fig. 2 (cont)

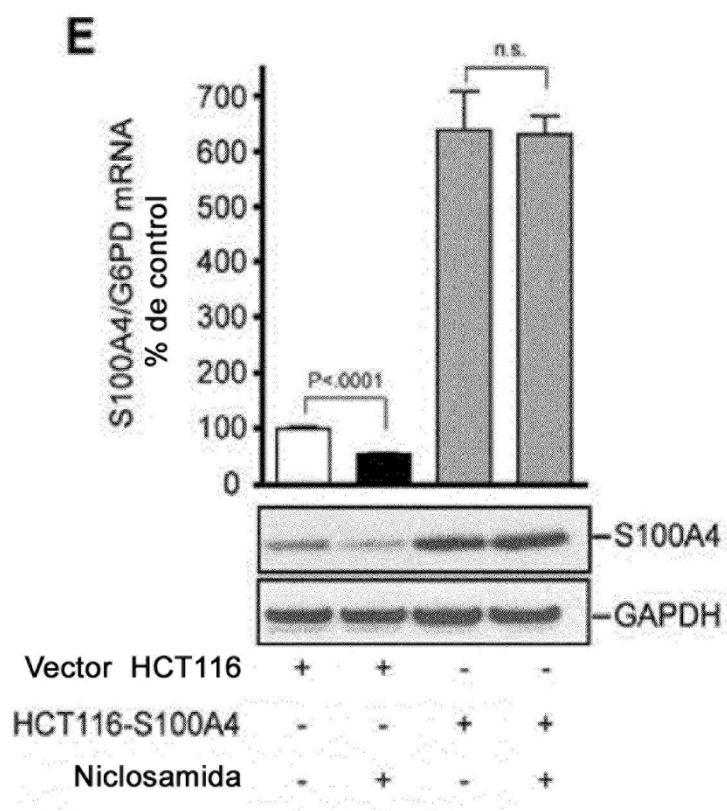


Fig. 3

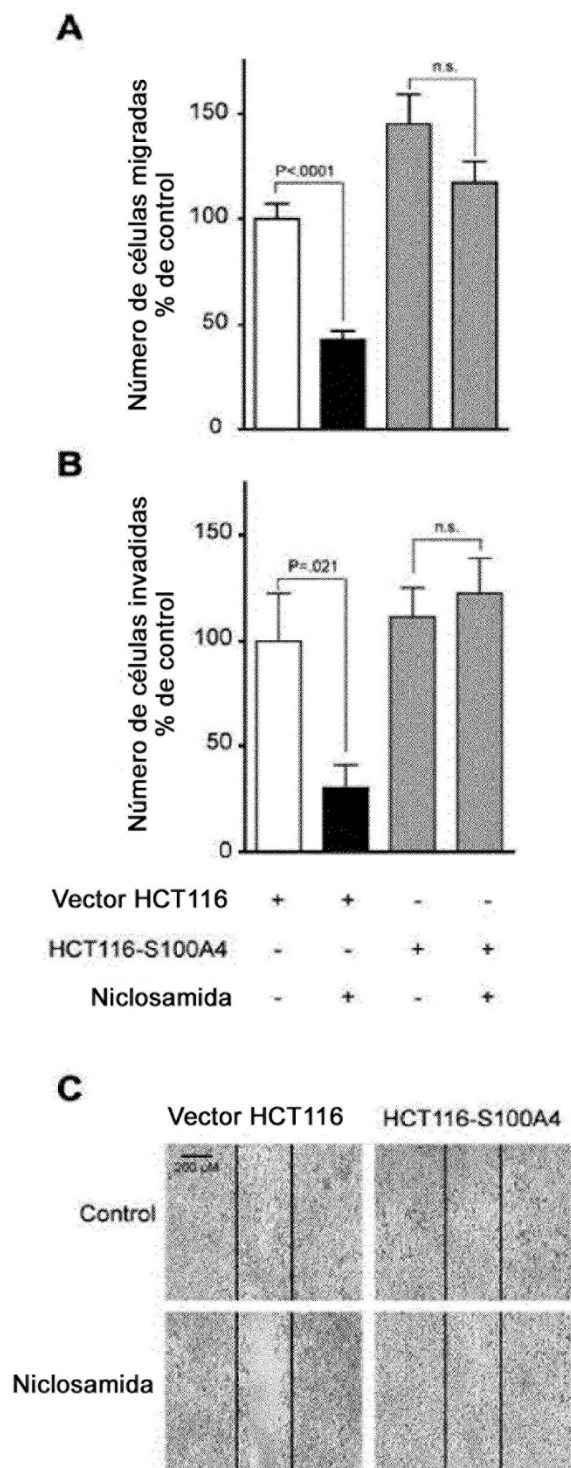


Fig. 3 (cont)

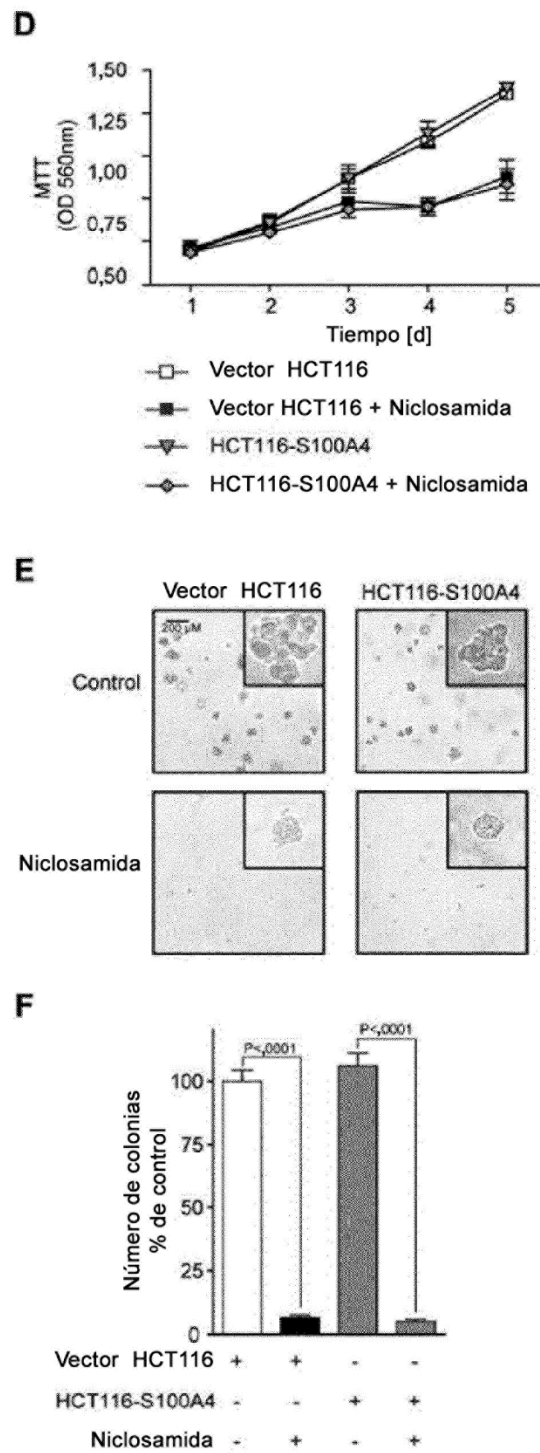


Fig. 4

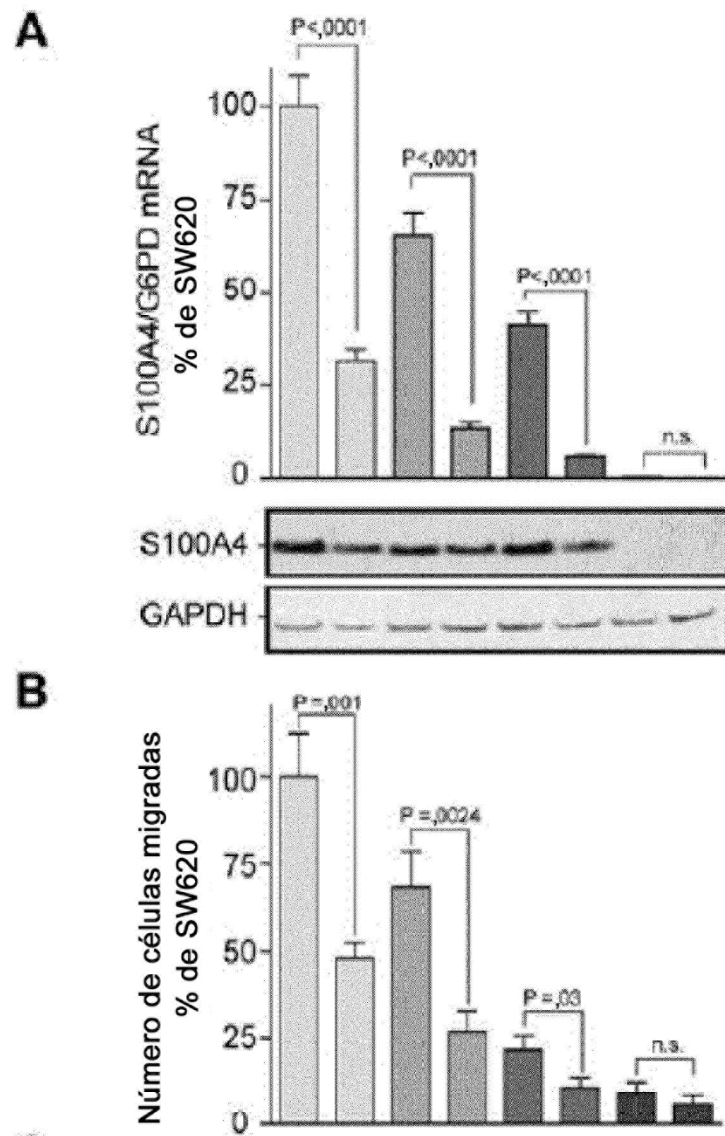


Fig. 4 (cont)

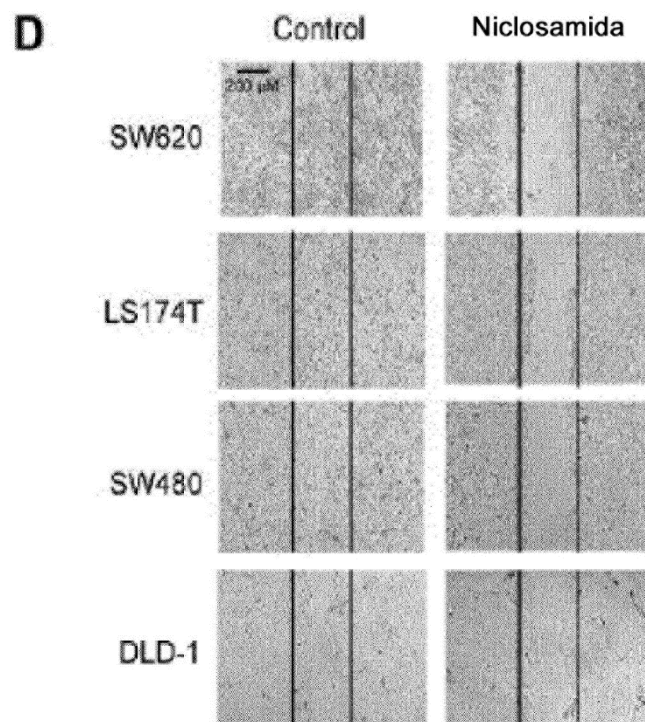
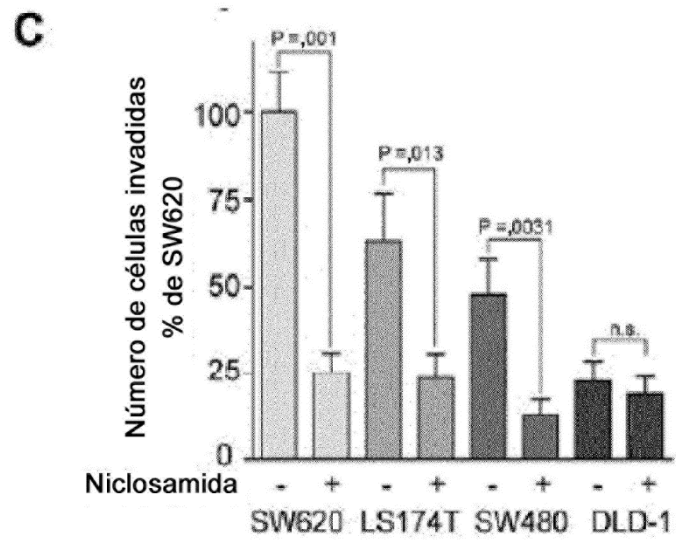


Fig. 4 (cont)

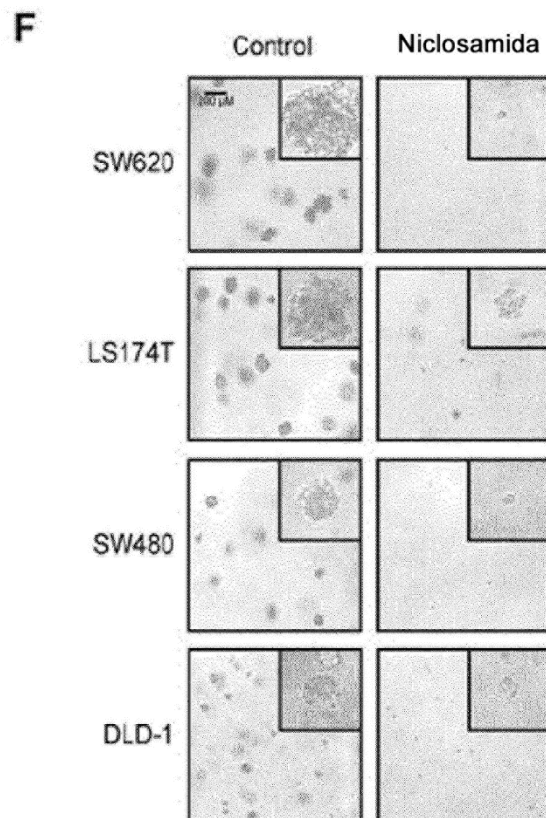
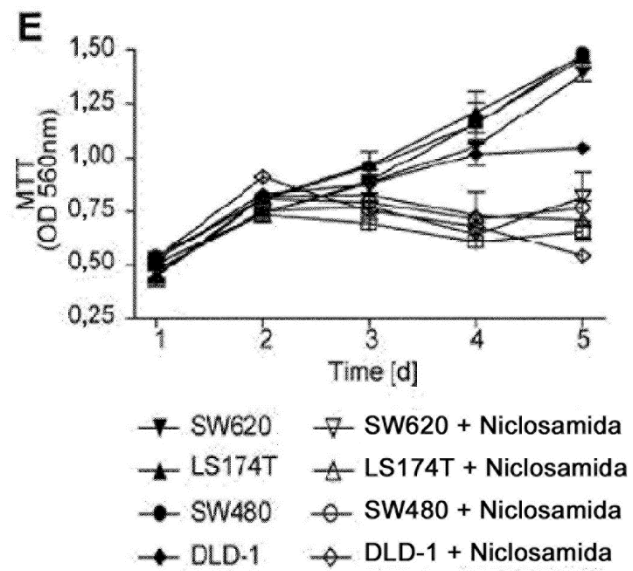


Fig. 4 (cont)

**G**

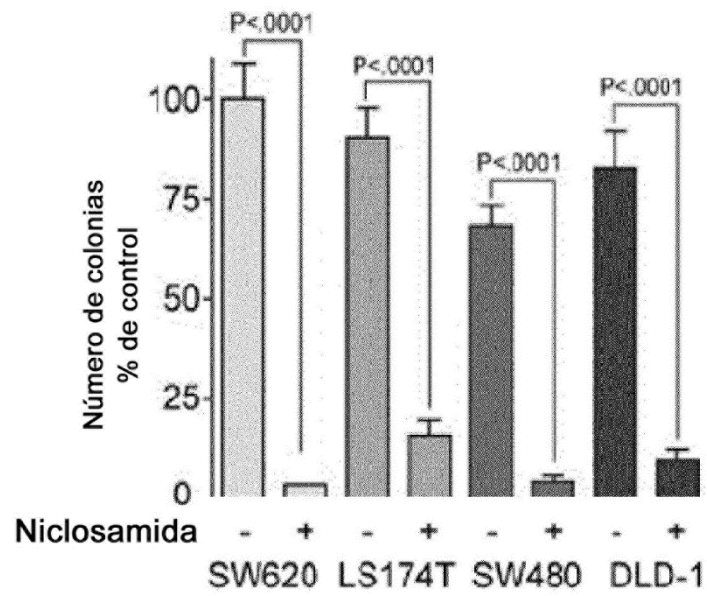


Fig. 5

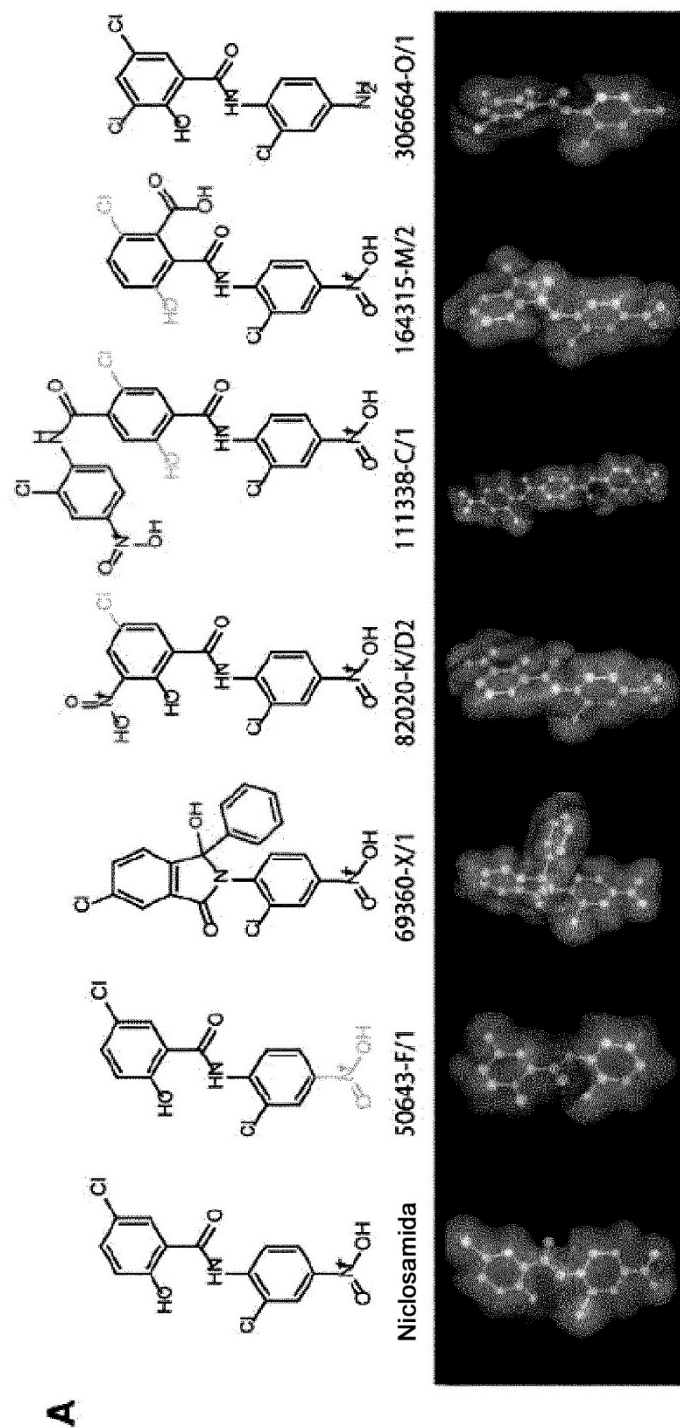


Fig. 5 A (cont)

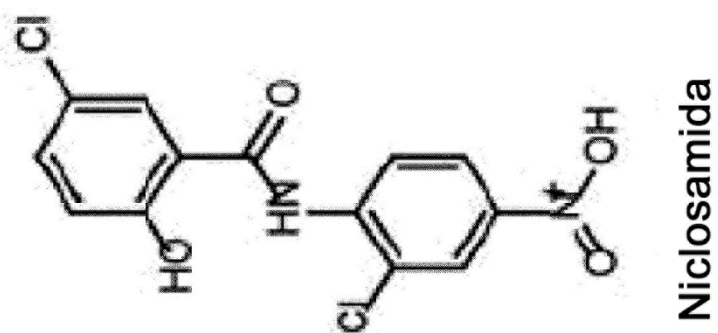
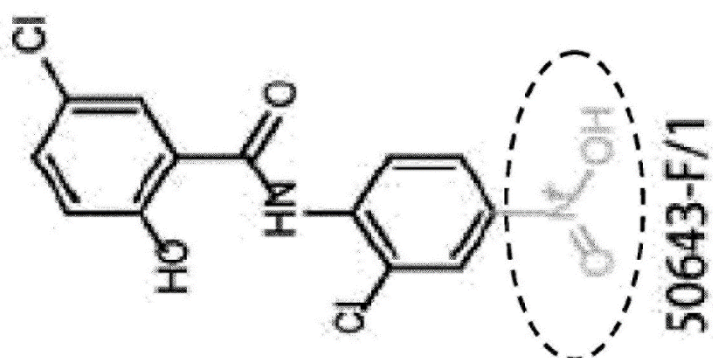
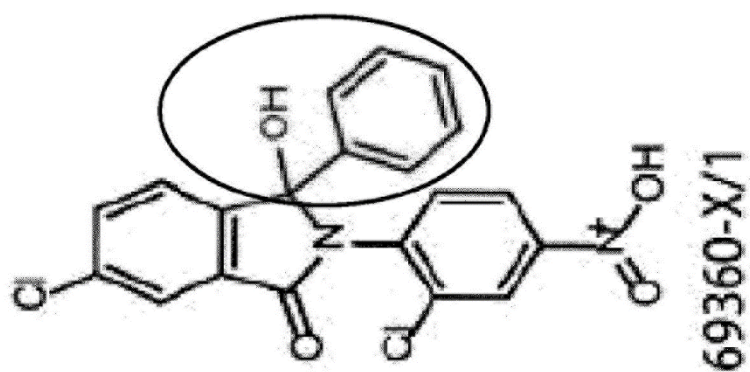


Fig. 5 A (cont)

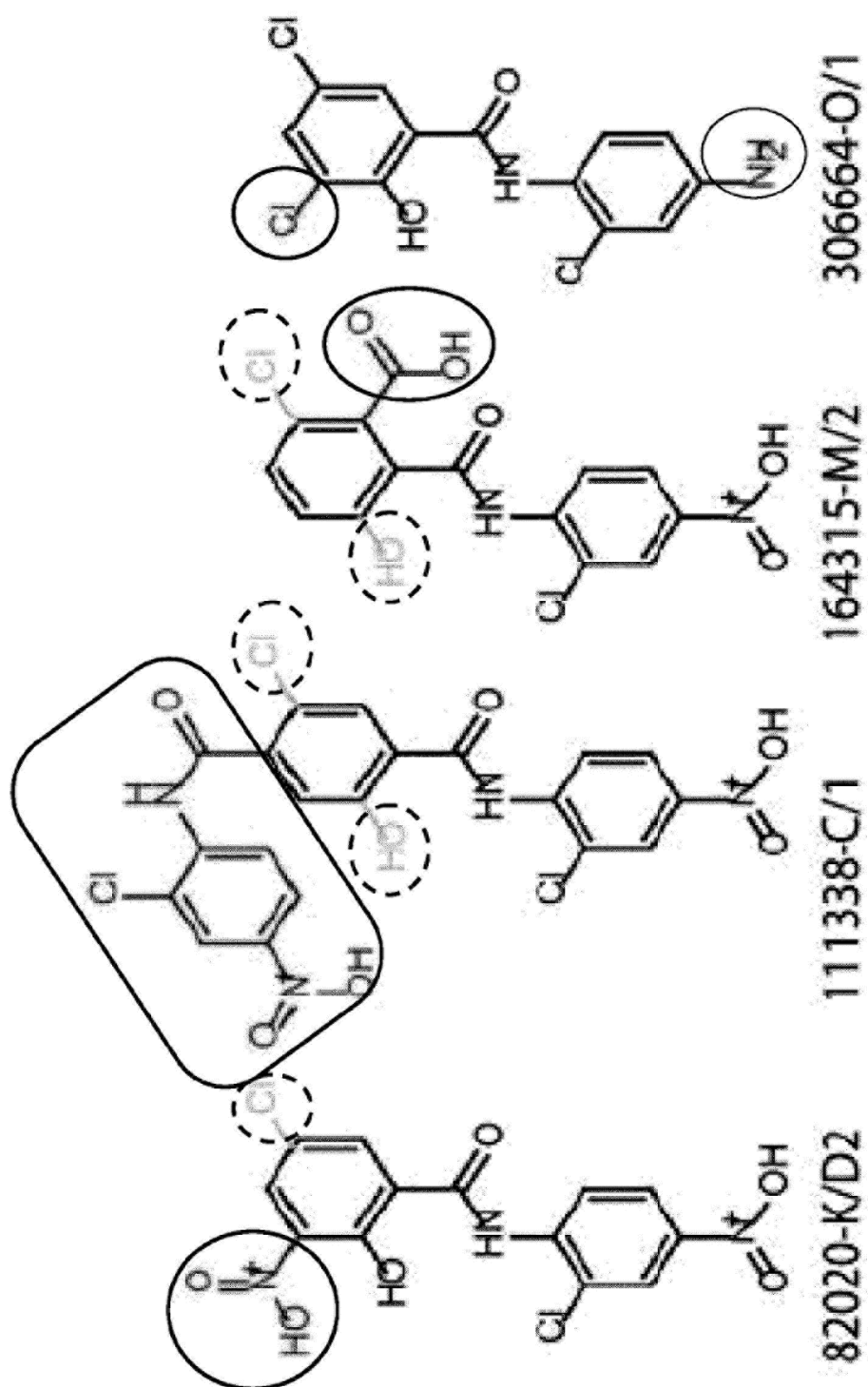


Fig. 5 (cont)

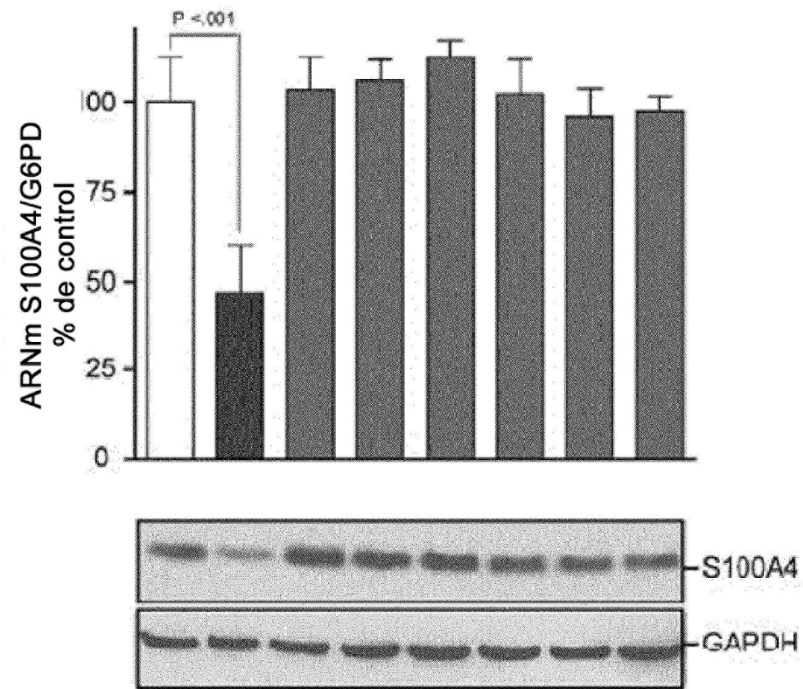
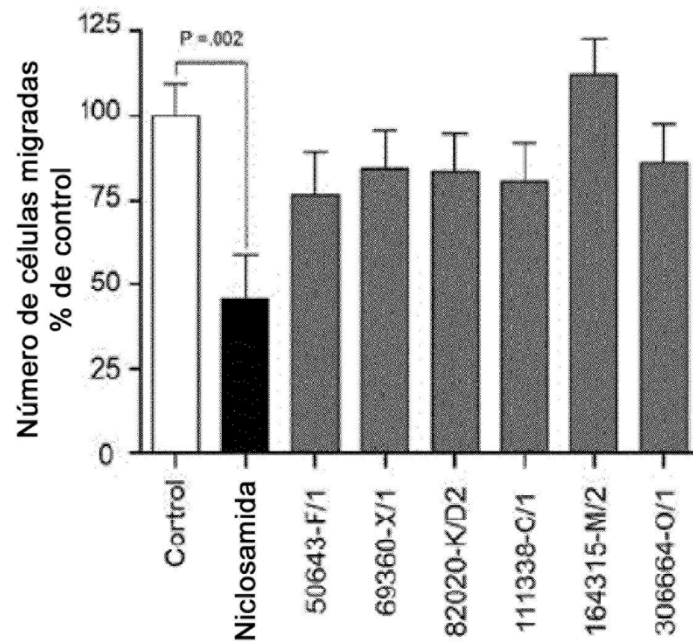
**B****C**

Fig. 6

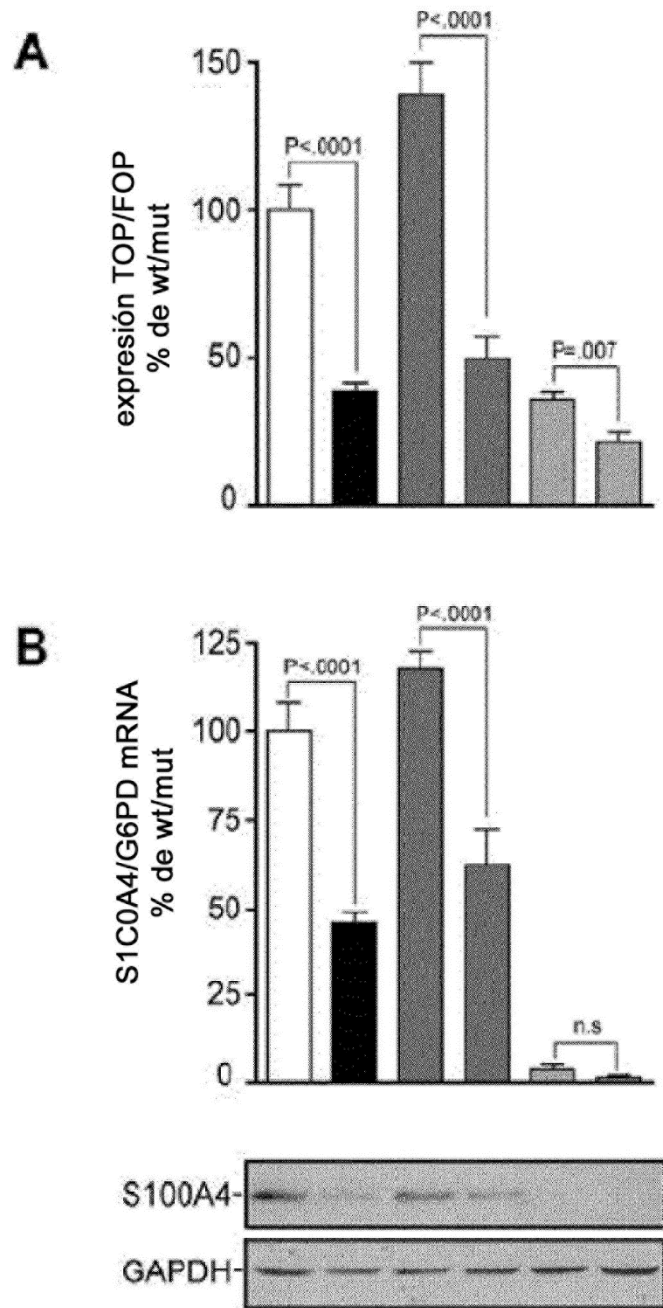
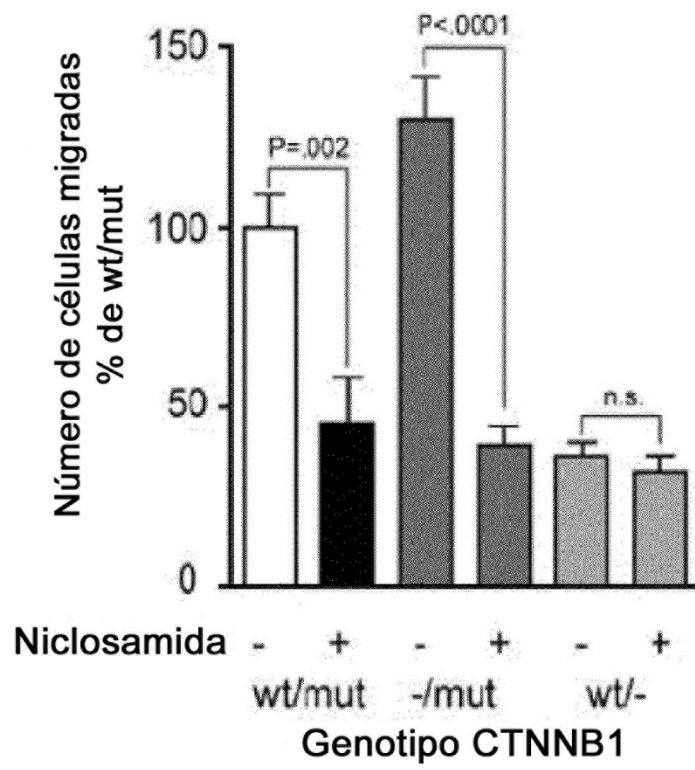


Fig. 6 (cont)

**C**



**D**

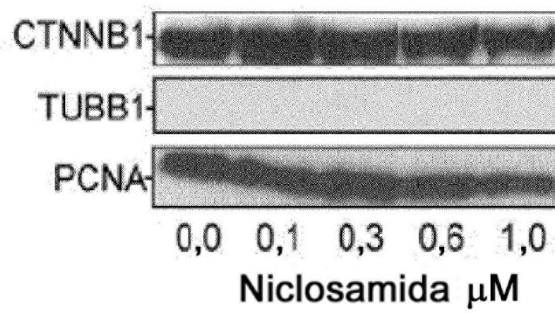
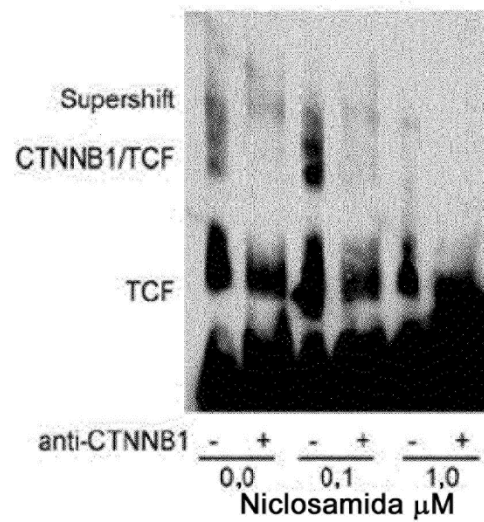
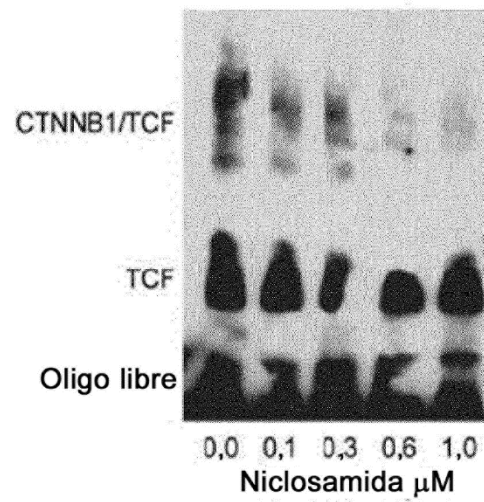


Fig. 6 (cont)

**E**



**F**

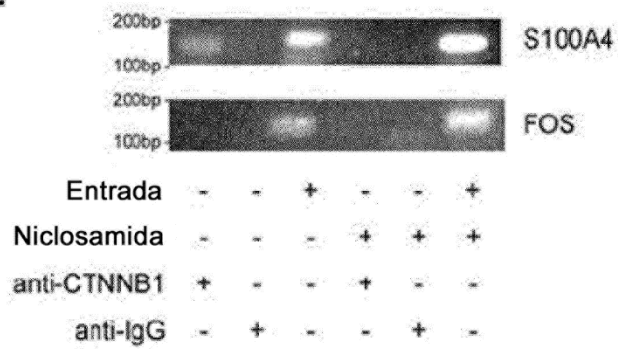


Fig. 7

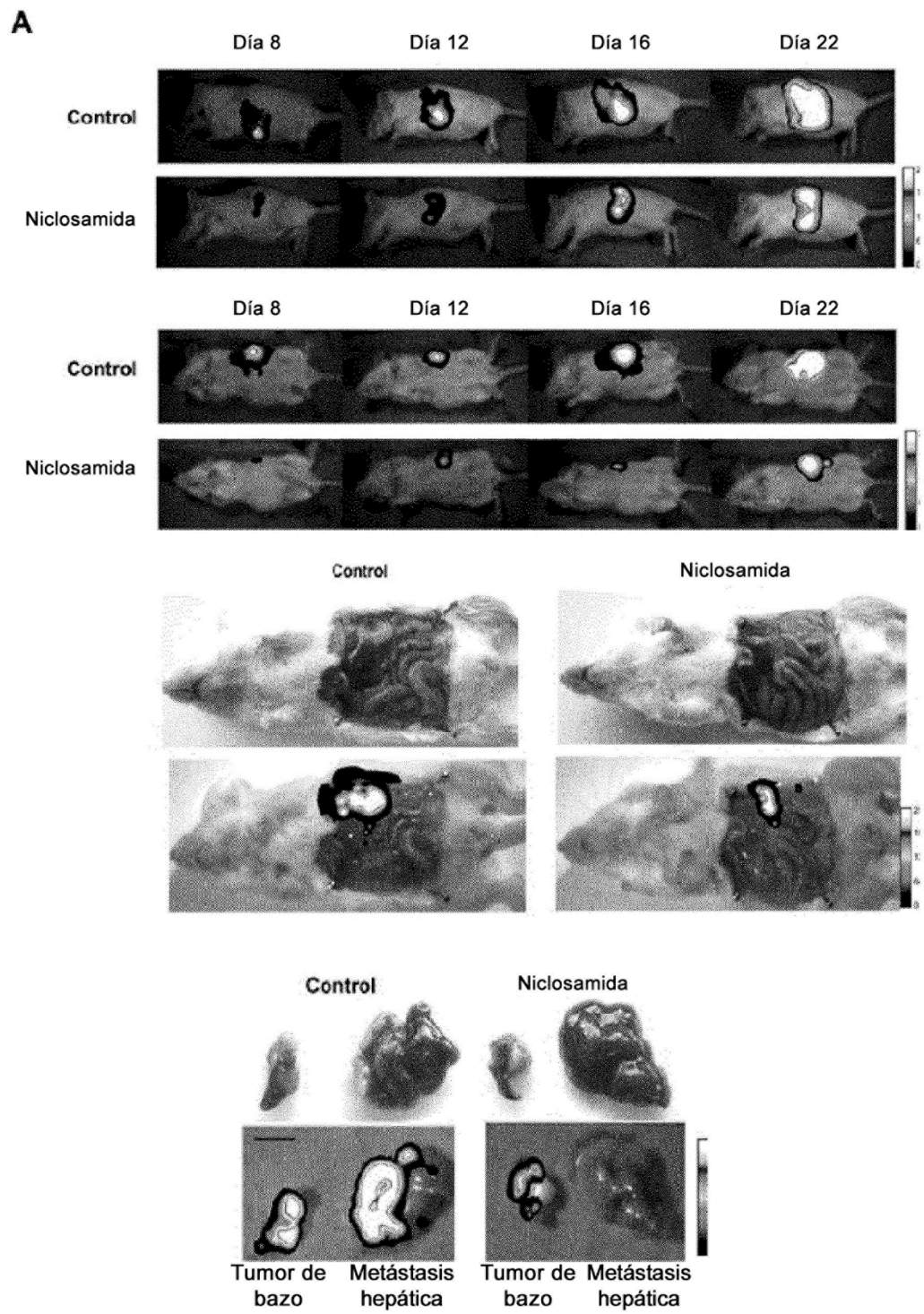


Fig. 7 (cont)

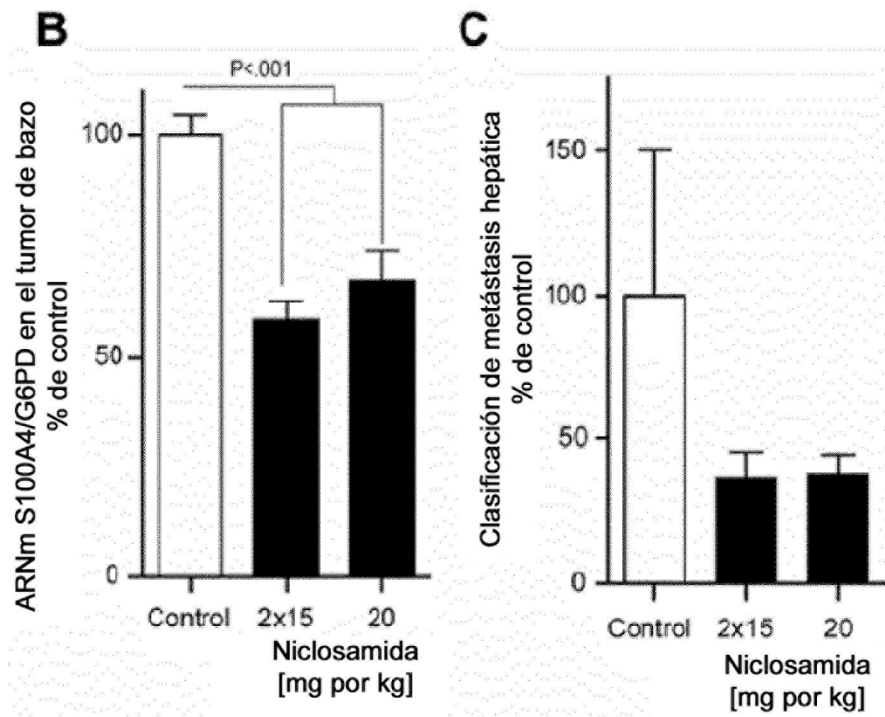


Fig. 8

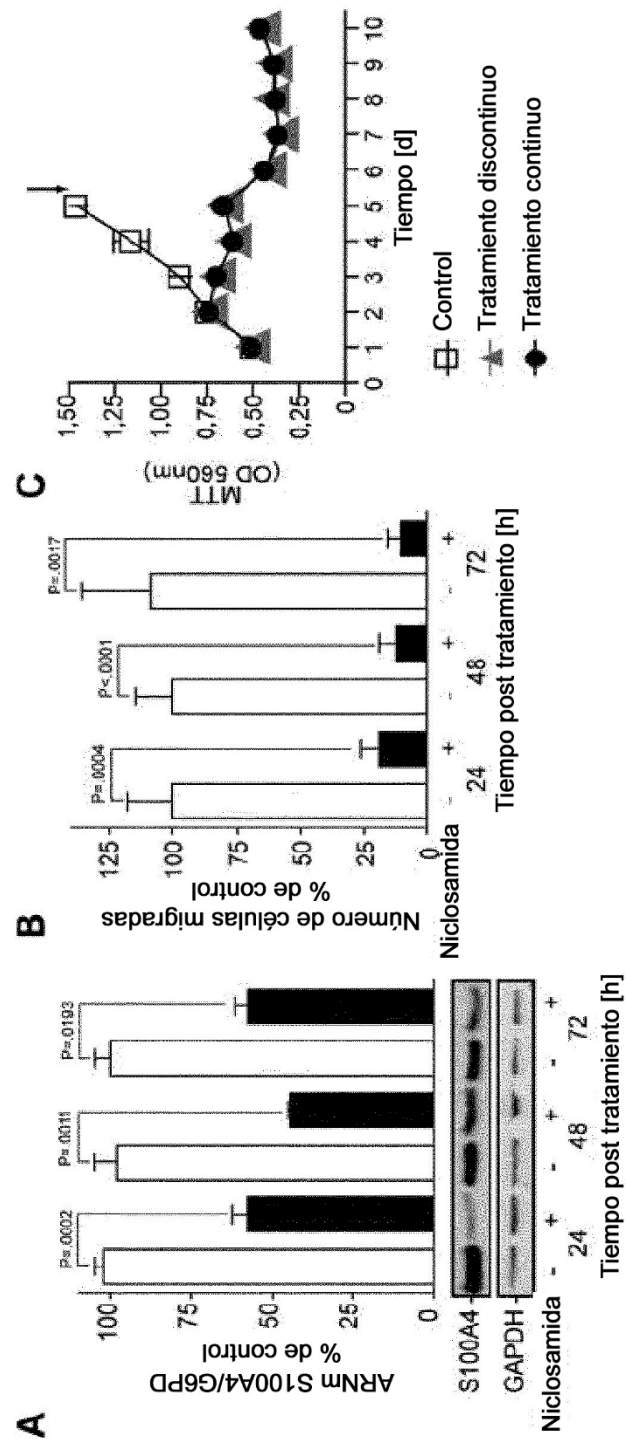


Fig. 8 (cont)

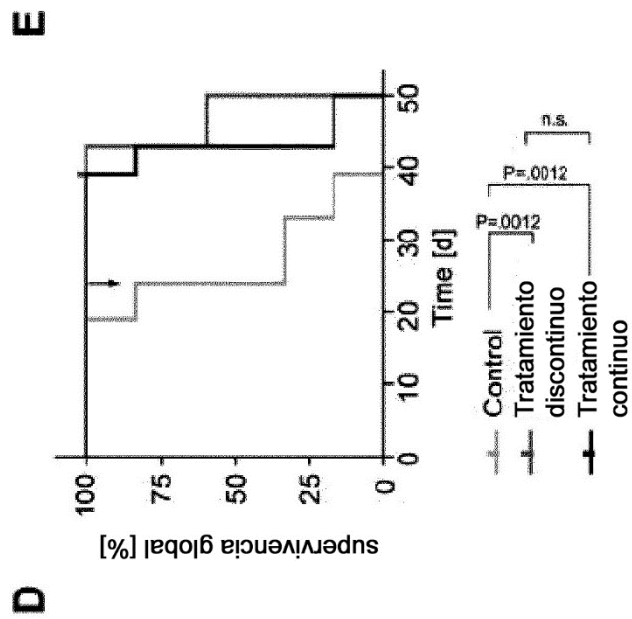
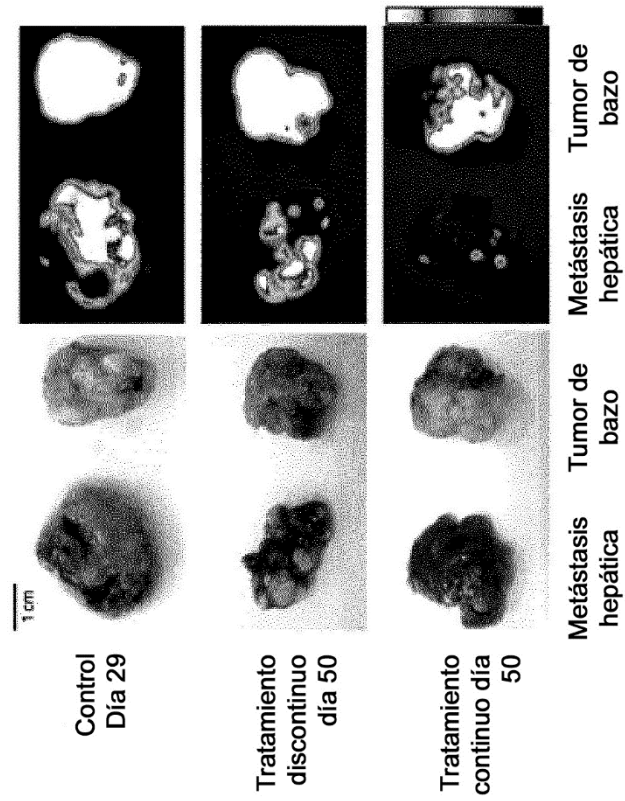


Fig. 8 (cont)

