

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 724**

21 Número de solicitud: 202130062

51 Int. Cl.:

**A61K 31/513** (2006.01)

**C07D 413/12** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**26.01.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.07.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**27.10.2022**

Fecha de concesión:

**08.06.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**15.06.2023**

73 Titular/es:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN ANTONIO  
(33.3%)  
CAMPUS DE LOS JERONIMOS, 135  
30107 GUADALUPE (Murcia) ES;  
FUNDACION PARA LA FORMACION E  
INVESTIGACIÓN SANITARIAS (FFIS) (33.3%) y  
UNIVERSIDAD DE GRANADA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CONESA ZAMORA, Pablo;  
ALBURQUERQUE GONZALEZ, Begoña;  
PEREZ SANCHEZ, Horacio;  
MONTORO GARCÍA, Silvia;  
GARCÍA SOLANO, José;  
BERNABE GARCÍA, Angel;  
NICOLAS VILLAESCUSA, Francisco Jose;  
BERNABE GARCÍA, Manuel;  
CAYUELA FUENTES, Maria Luisa;  
PEÑA GARCÍA, Jorge;  
LUQUE FERNÁNDEZ, Irene;  
RUIZ SANZ, Javier y  
MARTÍNEZ HERRERÍAS, José Cristobal**

74 Agente/Representante:

**DIAZ PACHECO, Maria Desamparados**

54 Título: **RALTEGRAVIR PARA USO COMO INHIBIDOR DE LA FASCINA1 EN CÁNCER**

57 Resumen:

Raltegravir para uso como inhibidor de Fascina1 en cáncer.

La presente invención se refiere a un inhibidor de la Fascina1 para su uso en un método de tratamiento para el cáncer, en el que se trata a pacientes que padecen cáncer porque las células cancerosas son positivas para la expresión de Fascina1, siendo dicho inhibidor raltegravir. También se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho inhibidor de la Fascina1.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 919 724 B2

## DESCRIPCIÓN

### RALTEGRAVIR PARA USO COMO INHIBIDOR DE LA FASCINA1 EN CÁNCER

#### Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los medicamentos, en particular a los productos terapéuticos contra el cáncer.

#### 5 Estado de la técnica anterior a la invención

La identificación de dianas moleculares es uno de los mayores avances en el tratamiento del cáncer. Estas terapias tienen como objetivo bloquear proteínas específicas que se ven alteradas en el cáncer y son responsables del fenotipo tumoral. La metástasis tumoral sigue siendo la principal causa de mortalidad por cáncer (Chen, Yang, Jakoncic, Zhang y Huang, 2010) y la adquisición previa de capacidad invasora es un requisito para que las células del carcinoma accedan a los vasos y, por tanto, se extiendan por todo el cuerpo. Este proceso implica un reordenamiento del citoesqueleto de actina que permite que las células tumorales desarrollen protuberancias celulares, como filopodios e invadopodios, que contribuyen a la migración, invasión y metástasis de las células cancerosas (Machesky y Lia., 2010). La Fascina1 es una proteína clave en la formación de filopodios e invadopodios, ya que posee actividad de unión y agrupación de actina mediante el entrecruzamiento de la actina filamentosa en haces paralelos muy compactos. La Fascina1 está ausente en la mayoría de los epitelios normales, pero se expresa en muchos carcinomas humanos (Hashimoto, Kim y Adams, 2011) y varios estudios previos han designado a esta proteína como un biomarcador candidato para carcinomas agresivos. De hecho, varios estudios, incluido un meta-análisis, han demostrado que la expresión de Fascina1 está asociada con un aumento de las metástasis en los ganglios linfáticos y la progresión de la enfermedad y la mortalidad en el cáncer colorrectal y de mama (Tan, Lewis, Adams y Martin, 2013).

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa principal de muerte relacionada con el cáncer en hombres y mujeres en los Estados Unidos. Hay varias formas de tratar el cáncer colorrectal, según su tipo y estadio. Como regla general, el tumor localizado se resecta si no hay metástasis o complicaciones a distancia. Si hay afectación ganglionar, se puede administrar quimioterapia y en el caso de cáncer de recto se recomienda terapia de radioterapia (neoadyuvante) preoperatoria. Si existe metástasis a distancia,

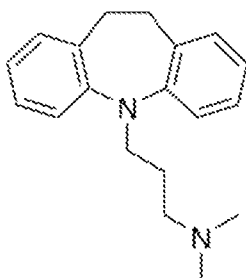
la quimioterapia y los anticuerpos monoclonales son el tratamiento clave asociado a la radioterapia y / o cirugía en algunas ocasiones.

La quimioterapia va dirigida a atacar las células en proliferación, incluidas, entre otras, las células cancerosas. La quimioterapia común en el CCR incluye 5-fluorouracilo, capecitabina, oxaliplatino, irinotecán y raltitrexed.

El adenocarcinoma serrado (ACS) ha sido reconocido recientemente en la última clasificación de tumores del sistema digestivo de la OMS (Organización Mundial de la Salud) como un nuevo subtipo de CCR. Se han propuesto y validado criterios para su diagnóstico histológico en una serie que comprende 81 casos. La frecuencia de ACS oscila entre el 7,5 y el 8,7% de todos los CCR y se ha demostrado que tiene peor pronóstico que el carcinoma convencional (CC). En consecuencia, el ACS, muestra una frecuencia más alta de características histológicas adversas frente al CC en el frente invasivo. Estas características incluyen la gemación de tumores de alto grado y pseudofragmentos citoplasmáticos, patrón de crecimiento infiltrante y una respuesta de linfocitos peritumoral débil. Recientemente, un estudio inmunohistoquímico sobre moléculas de adhesión, ha demostrado un patrón de expresión diferente de ACS en comparación con CC. De acuerdo con la evidencia previa, dos estudios previos sobre perfiles de ARNm, incluido el nuestro, han revelado que el ACS mostró una mayor activación de las funciones relacionadas con la morfogénesis, hipoxia, citoesqueleto y transporte de vesículas y también la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  (un factor inducible por hipoxia), el gen antiapoptótico hippocalcina y la Fascina1 (proteína de agrupación de actina asociada con invasión) en comparación con el carcinoma convencional (CC) (Laiho et al., 2007; Tuomisto et al., 2016). Además, se encontró que la Fascina1 era el marcador más discriminatorio para distinguir ACS de CC con una sobreexpresión inmunohistoquímica en el primero de 88,6% en comparación con 14,3% en CC. Incluso los tumores que muestran características histológicas y moleculares de inestabilidad de microsatélites mostraron menor expresión de Fascina1 que ACS (50%). Los ensayos de qPCR que analizaron la expresión de Fascina1 en estos subtipos de CRC también confirmaron estos hallazgos (Conesa-Zamora et al., 2013).

Dado el papel causal de la Fascina1 en el fenotipo invasor de las células tumorales y su sobreexpresión asociada con una peor supervivencia en una amplia variedad de tipos de cáncer (Tan et al., 2013), incluidos muchos sin terapia molecular personalizada como el carcinoma de mama triple negativo, urge la necesidad de buscar nuevos inhibidores  
5 eficaces contra la Fascina1. En esta línea, la migrastatina y sus análogos se consideran inhibidores típicos de la Fascina1 disminuyendo así la migración de células tumorales metastásicas, la invasión y la metástasis tumoral (Chen et al., 2010) a pesar de que su compleja estructura dificulta el proceso de síntesis química.

Recientemente, el antidepresivo imipramina ha demostrado propiedades anti-fascina,  
10 anti-invasivas y anti-metastásicas en células de cáncer colorrectal (Albuquerque et al. 2020) La imipramina (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>) es 3- (5,6-dihidrobenzo [b] [1] benzazepin-11-il) -N, N-dimetilpropan-1-amina y tiene la siguiente fórmula química:



Dos estudios independientes, incluido el nuestro en población finlandesa y española,  
15 han demostrado que los ACS muestran una mayor frecuencia de mutaciones de KRAS y BRAF en comparación con el adenocarcinoma colorrectal convencional (García-Solano et al., 2012; Stefanius et al., 2011). Es por ello que el ACS es más resistente a la terapia anti-EGFR en la que se obtiene eficacia cuando KRAS y BRAF no están mutados. Además, los ACS son en su mayoría estables a microsatélites y, por lo tanto,  
20 no pueden beneficiarse de los inhibidores inmunitarios como el pembrolizumab.

Dada la alta expresión de Fascina1 en ACS y su papel en la invasión y metástasis tumoral, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende raltegravir (RAL) para su uso en el tratamiento de CRC, ACS y otros tumores que sobreexpresan Fascina1.

25 Raltegravir es un medicamento antirretroviral que se usa, junto con otros medicamentos, para tratar el VIH / SIDA. Otros trabajos describen el uso de este compuesto en el

tratamiento de cánceres, sin embargo, su mecanismo de acción a través de la Fascina1 nunca ha sido identificado.

El artículo científico publicado por Chang y colaboradores (2019) revela la actividad antitumoral del RAL en líneas celulares de cáncer de pulmón con alta expresión de la enzima ALDOA. Este documento implica que la eficacia del tratamiento se debe a la unión raltegravir-ALDOA. Sin embargo, la presente invención se refiere a un mecanismo de acción diferente, mediado por Fascina1. Además, el documento citado anteriormente no describe el uso de líneas celulares de CRC, ni líneas celulares de ACS.

### Descripción de la invención

Como se usa en el presente documento, "método de tratamiento" se refiere a la administración de una composición, agente o inhibidor a un paciente el cual tiene un trastorno con el propósito de curar, aliviar, remediar, retrasar el inicio, prevenir o mejorar el trastorno, el síntoma de un trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición al mismo.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto o agente que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un paciente tratado. El método de tratamiento se puede realizar *in vivo* o *ex vivo*, solo o junto con otros fármacos o terapias. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración particular.

Como se usa en el presente documento, "cáncer en el que la Fascina1 está sobreexpresada" significa que hay un nivel de expresión anormalmente más alto que el nivel (o cantidad) de la expresión del gen Fascina1 basal que se expresa en tejidos normales (o células normales).

El término "paciente" no está limitado, siempre que sea un animal. Preferiblemente, el sujeto es un animal mamífero, tal como un ser humano, perro, gato, caballo, ganado o vaca, o cualquier otro tipo de animales mamíferos criados, por ejemplo, en zoológicos, preferiblemente un ser humano. Entre dichos animales, un sujeto que tiene un tumor que sobreexpresa el gen de la Fascina1 es el animal al que nos referimos en la presente invención.

El término "cáncer de colon" como se usa en este documento se refiere a cualquier cáncer que se origina en el colon o recto, especialmente adenocarcinoma serrado, pero también tumor del estroma gastrointestinal, carcinoma de células escamosas, neuroendocrino y sarcoma de colon. Para la presente invención, estos cánceres deben tener una sobreexpresión de Fascina.

El término "ARNm" se refiere a un polímero de ribonucleótidos, ácido ribonucleico mensajero.

La presente invención se refiere a un inhibidor de la Fascina1 para su uso en un método de tratamiento para el cáncer, en el que se trata a pacientes con cáncer en el que se detecta expresión de Fascina1 en al menos el 10% de las células cancerosas de una muestra obtenida del paciente, siendo dicho inhibidor Raltegravir (RAL).

Raltegravir es el compuesto denominado N - [(4-Fluorofenil) metil] -1,6-dihidro-5-hidroxi-1-metil-2- [1-metil-1 - [(5-metil-1,3, 4-oxadiazol-2-il) carbonil] amino] etil] -6-oxo-4 pirimidincarboxamida, de fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FKN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>. Además, raltegravir también incluye una sal, disolvente y / o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

La Fascina1 se detecta en al menos el 15% de las células cancerosas de una muestra obtenida del paciente, preferiblemente al menos el 20% de las células cancerosas, más preferiblemente, al menos el 25% de las células cancerosas, incluso más preferiblemente al menos el 30% de las células cancerosas, incluso más preferiblemente al menos el 40% de las células cancerosas. %, incluso más preferiblemente al menos 50% de las células cancerosas, incluso más preferiblemente al menos 60% de las células cancerosas e incluso más preferiblemente al menos 70% de las células cancerosas.

La descripción proporciona un método para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, cáncer en el sentido de que la Fascina1 sea detectada en al menos el 10% de las células cancerosas. El método incluye (i) obtener del paciente una muestra, preferiblemente una biopsia del cáncer; (ii) medir en la muestra la cantidad de células cancerosas positivas para la proteína Fascina1 mediante inmunotinción (por ejemplo, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia), (iii) calcular el% de células cancerosas positivas para fascin1 del total de células cancerosas de la muestra.

Se determina que el sujeto tiene, o corre el riesgo de tener, cáncer si las células positivas para la expresión de la proteína Fascina1 son al menos el 10% de las células cancerosas totales de la muestra obtenida del paciente. La muestra puede ser una muestra de fluido corporal o una muestra de biopsia sólida. El método también puede  
5 usarse para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, recaída de cáncer metastásico, o para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, cáncer o cáncer metastásico que es resistente a quimioterápicos o terapias dirigidas.

La metodología para evaluar las células positivas para Fascina1 es mediante tinción inmunohistoquímica como se ha descrito previamente (Conesa-Zamora et al.2013):  
10 Para considerar que una célula tumoral es positiva para la expresión de Fascina1, se realiza una tinción citoplásmica de Fascina1 en células cancerosas.

Las células cancerosas positivas para Fascina1 se pueden detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, inmunotinción, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Una persona experta sabría  
15 cómo identificar células cancerosas positivas para Fascina1 utilizando protocolos establecidos.

Fascina1 se detecta mediante inmunotinción, preferiblemente inmunohistoquímica.

El protocolo de inmunohistoquímica y los materiales empleados así como el anticuerpo contra la Fascina1, son los descritos en el trabajo Conesa-Zamora et al. 2013 en  
20 particular en la información complementaria S1.

Cuando una persona experta o un patólogo está analizando una muestra de un paciente teñida para la Fascina1, podría encontrar que la tinción no es uniforme dentro de la muestra o las células cancerosas de la muestra. Se considera una expresión positiva, una tinción de la Fascina1 en el endotelio vascular mientras que la ausencia de  
25 expresión de Fascina1 en mucosa normal es considerada como expresión negativa.

Un patólogo o una persona experta en el campo sabría cómo realizar el procedimiento de tinción. Además, el experto en la materia sabría cómo diferenciar la célula cancerosa de otras células dentro de la muestra del paciente. Por ejemplo, mediante una tinción regular con hematoxilina y eosina (H&E) o mediante el uso de marcadores de células  
30 tumorales específicos como citoqueratinas: CK20, CK7, CKAE1 o CKAE3.

La función de la Fascina1 está estrechamente relacionada con la motilidad celular, ya que es una proteína del citoesqueleto. Se expresa ampliamente en tejidos de origen ectodermo o endodermo.

5 El cáncer en el que se detecta la Fascina1 es un cáncer de origen en tejidos derivados del ectodermo o endodermo.

Los cánceres en el que se detecta la Fascina1 son cáncer colorrectal, carcinoma de mama triple negativo y cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal es un adenocarcinoma serrado.

10 Las células tumorales del adenocarcinoma serrado poseen genes KRAS y BRAF nativos.

Un médico reconocería las mutaciones puntuales particulares en KRAS y BRAF que están asociadas con el cáncer; por ejemplo, en el caso de KRAS, las mutaciones puntuales más relevantes en la secuencia polipeptídica son: G12C, G12V, G12S, G12D, 15 G12A, G12R y G13R. En el caso de BRAF, la mutación puntual más relevante en la secuencia polipeptídica es: V600E

El tratamiento del cáncer se considera como la supresión de la colonización metastásica.

20 La supresión de la colonización metastásica comprende la supresión de la colonización metastásica en al menos un órgano como pulmón, hígado y ganglios linfáticos.

Fascina1 es una proteína encargada del reordenamiento del citoesqueleto de actina, la secuencia de ADN humano del gen de la fascina1 se puede encontrar en la base de datos Ensembl con el código ENSG00000075618. La secuencia de la proteína humana Fascina1 se puede encontrar en la base de datos UniprotKB con el código Q16658.

25 Raltegravir actúa como inhibidor de la Fascina1 al unirse a él y prevenir la invasión y metástasis de células cancerosas.

El tratamiento comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de Raltegravir.

La dosis particular administrada de acuerdo con esta invención estará determinada por las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo el Raltegravir



administrado, la vía exacta de administración, el cáncer particular que se está tratando, el sujeto receptor y consideraciones similares.

Un médico experto en la materia conocería la mejor vía de administración, dosis y concentración para lograr un efecto terapéutico.

- 5 El raltegravir se puede administrar por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como a cualquier técnica de infusión adecuada.

- 10 La concentración de Raltegravir, en este caso en particular, ha sido establecida entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ , preferiblemente 1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ .

- Para confirmar la inhibición de fascin1 o el tratamiento, se puede evaluar y / o verificar la inhibición de la supervivencia de las células cancerosas, la supervivencia hipóxica, la supervivencia metastásica o la colonización metastásica usando tecnología conocida en la técnica antes y / o después del paso de administración. Estas tecnologías incluyen exploraciones por TC o exploraciones por PET de órganos del cuerpo.
- 15

- De manera adicional a la invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de Fascina 1 descrito anteriormente, para su uso en un método de tratamiento para el cáncer, en el que se trata a pacientes con cáncer en el que se detecta Fascina1 en, al menos, el 10% de las células cancerosas de una muestra obtenida del paciente que comprende al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 20

- Se entiende como un "vehículo farmacológicamente aceptable", a aquel que después de ser administrado sobre un sujeto, no causa efectos fisiológicos indeseables. El vehículo en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" también en el sentido de que sea compatible con el ingrediente activo y pueda ser capaz de estabilizarlo. Se pueden utilizar uno o más agentes solubilizantes como vehículos farmacológicos para el suministro de un compuesto activo. Los ejemplos de un vehículo farmacológicamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes biocompatibles para lograr una composición utilizable como forma de dosificación. Los ejemplos de otros vehículos incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, lauril sulfato de sodio y D&C Yellow 10.
- 25
  - 30

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal. El término "parenteral", como se usa en este documento, se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o  
5 intracraneal, así como a cualquier técnica de infusión adecuada.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar como un inyectable estéril que puede ser una solución o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Tales soluciones incluyen, pero no se limitan a, 1,3-butanodiol, manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos se emplean convencionalmente como disolvente o  
10 medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, versiones polioxetiladas de los mismos. Estas  
15 soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares, que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticamente aceptables sólidas,  
20 líquidas u otras formas de dosificación, también pueden usarse con el propósito de formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, incluidas cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de tabletas, los vehículos comúnmente  
25 usados incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran suspensiones o emulsiones acuosas por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase aceitosa combinada  
30 con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

La composición farmacéutica para la administración oral tiene al menos uno de los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en EP2529741B1.

Las composiciones farmacéuticas para la administración tópica según la invención descrita se pueden formular como soluciones, ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, aerosoles, aerosoles o aceites. Alternativamente, las formulaciones tópicas pueden estar en forma de parches o apósitos impregnados con ingrediente (s) activo (s), que opcionalmente pueden comprender uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones preferidas, las formulaciones tópicas incluyen un material que potenciaría la absorción o penetración del agente o agentes activos a través de la piel u otras áreas afectadas.

Una composición tópica contiene una cantidad segura y eficaz de un vehículo dermatológicamente aceptable adecuado para su aplicación en la piel. Una composición o componente "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable" se refiere a una composición o componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares indebidas. El vehículo permite administrar un agente activo y un componente opcional a la piel en una concentración o concentraciones apropiadas. Por tanto, el vehículo puede actuar como diluyente, dispersante, disolvente o similar para garantizar que los materiales activos se apliquen y distribuyan uniformemente sobre el objetivo seleccionado a una concentración apropiada. El vehículo puede ser sólido, semisólido o líquido y puede estar en forma de loción, crema o gel, en particular uno que tenga un espesor o límite de elasticidad suficiente para evitar la sedimentación de los materiales activos. El vehículo puede ser inerte o poseer beneficios dermatológicos. También debería ser física y químicamente compatible con los componentes activos descritos en este documento y no debería perjudicar indebidamente la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con la composición.

Un agente terapéutico puede administrarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o en una composición junto con otros fármacos o terapia, es decir, una terapia de cóctel. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores, particularmente tumores malignos, los agentes se pueden usar solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, antiangiogénicos y / o inmunotoxinas o coaguligandos. En algunas realizaciones, la administración de una composición farmacéutica de dos o más agentes / terapias es simultánea. En otras realizaciones, se administra un primer

agente / terapia antes de un segundo agente / terapia. Los expertos en la técnica comprenden que las formulaciones y / o vías de administración de los diversos agentes / terapias usados pueden variar.

La composición farmacéutica incluye administrar a la persona un agente terapéutico adicional. Los ejemplos del agente terapéutico adicional incluyen uno o más seleccionados del grupo que consiste en 5-fluoro uracilo, Oxaliplatino, Irinotecán, Capecitabina, Gemcitabina, Cetuximab, Taxol, Avastin, ácido folínico (leucovorina), Regorafenib, Zaltrap, inhibidores de la topoisomerasa I, NKTR -102, Tivantinib, PX-866, Sorafenib, Linifanib, inhibidores de quinasa, Telatinib, XL281 (BMS-908662), Robatumumab e inhibidores de IGF1-R.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar como tratamiento posterior o simultáneamente con otras terapias.

La composición farmacéutica se puede administrar con un intervalo de administración variable, por ejemplo de 1 a 7 veces por semana, preferiblemente de 2 a 6 veces por semana o de 3 a 5 veces por semana.

La dosis eficaz de Raltegravir y la composición farmacéutica que lo comprende depende de la naturaleza de las condiciones, la forma de ejecución y la formulación farmacéutica, y vendrá definida por la experiencia de un médico. La dosis eficaz de Raltegravir puede considerarse entre 0,0001 y aproximadamente 1000 mg / kg de peso corporal por día, o entre 0,01 y aproximadamente 500 mg / kg de peso corporal por día, o entre 0,01 y 100 mg / kg de peso corporal por día. o de 0,05 a aproximadamente 10 mg / kg de peso corporal por día. Por ejemplo, la dosis diaria para una persona adulta de aproximadamente 70 kg de peso corporal estará en el rango de 1 mg a 1000 mg, o entre 5 mg y 500 mg, y puede realizarse en dosis únicas o múltiples, diarias o no.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprender" y sus variaciones engloban el término "que consiste en". Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente

invención. Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento.

### Breve descripción de las imágenes

- 5 **Figura 1.** La dinámica molecular promedio resulta en más de 100 nanosegundos (ns) para las interacciones principales entre fascin1 con NP-G2-029 (G2) y raltegravir. (A) Residuos que interaccionan y tipos de interacción entre la Fascin1 y G2 (panel superior) y la Fascina1 y Raltegravir (panel inferior). (B) Representación bidimensional (2D) de las principales interacciones proteína-ligando entre la Fascina1 y G2 (izquierda) y Raltegravir (derecha). Se muestran las interacciones que ocurren más del 30.0% del
- 10 tiempo de simulación en la trayectoria seleccionada (0.00 a 100.00 nseg) Nota: es posible tener interacciones con > 100% ya que algunos residuos pueden tener múltiples interacciones de un solo tipo con el mismo átomo. Por ejemplo, la cadena lateral ARG tiene cuatro donantes de enlaces H que pueden formar enlaces de hidrógeno con un solo aceptor de enlaces H.
- 15 **Figura 2.** La unión del Raltegravir a la Fascina1 se validó aún más *in vitro* mediante experimentos de titulación de la fluorescencia, lo que genera una constante de disociación alta ( $K_d = 180 \pm 10 \mu\text{M}$ ). El panel superior, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia, el perfil de despliegue térmico de la proteína se controló siguiendo la señal de fluorescencia de un tinte hidrófobo que aumenta su señal de
- 20 fluorescencia al unirse a los parches hidrófobos que quedan expuestos a medida que se despliega la proteína. El panel inferior muestra la curva isoterma de unión de la Fascina1 en presencia de concentraciones crecientes de RAL. Los círculos blancos representan el centro de masa de los diferentes espectros, y las líneas continuas corresponden al mejor ajuste de los datos a un modelo de enlace de un sitio.
- 25 **Figura 3.** Interacción entre el Raltegravir y la Fascina1 observada por resonancia magnética nuclear (RMN) basada en ligandos. (A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de referencia del Raltegravir; (B) Espectros de RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD) y (C) Espectros de RMN WaterLOGSY (WL) del Raltegravir 500  $\mu\text{M}$  solo (negro)

o en presencia de Fascina1 10  $\mu$ M (rojo). La señal de  $^1\text{H}$  residual de  $\text{d}_6$ -dimetilsulfóxido ( $\text{d}_6$ -DMSO) está marcada con un solo asterisco (\*). Las señales aromáticas se muestran en los recuadros a la izquierda de cada panel.

5 **Figura 4.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observa la unión de actina en presencia de Fascina1 e inhibidores (tinción negativa). (A) Filamentos de actina F polimerizados. (B) En condiciones control (DMSO), los filamentos de actina se formaron haces en presencia de Fascina1 en una proporción de 1: 1. (C) F-actina y Fascina1 previamente incubados con Raltegravir 30  $\mu$ M y (D) con 10  $\mu$ M de control anti-fascina, compuesto G2. (E) Análisis cuantitativo del número de filamentos de actina en  
10 presencia de los compuestos y comparación con las condiciones de control (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

**Figura 5.** Se muestran los niveles de expresión de ARNm de Fascina1 en ocho líneas celulares colorrectales usando  $\beta$ -actina como control para la normalización de los datos.  
15 HCT-116 y SW-480 muestran la expresión de Fascina1 más alta, mientras que LOVO, DLD-1 y HT-29 muestran la más baja.

**La Figura 6.** Se muestra el ensayo de viabilidad. Se observa la viabilidad celular de dos líneas celulares colorrectales DLD-1 y HCT-116 tras el tratamiento con Migrastatina como control anti-fascina (A) y Raltegravir (B).

20 **La Figura 7.** Inmunofluorescencia de Fascina1 (A-J) y Actina (K-T) en dos líneas celulares; HCT-116 (A-E, K-O) y una línea celular de queratinocitos derivada de una línea celular no tumoral HaCaT (F-J, P-T). Se muestra la inmunofluorescencia con anticuerpos contra Fascina1 y Actina, observándose la inhibición de la formación de filopodios causada por los tratamientos con Raltegravir (RAL) y Migrastatina (MGS).

25 **La Figura 8.** Se muestra la inhibición de la migración de dos líneas celulares provocada por el tratamiento con Raltegravir y Migrastatina. (A) HCT-116, (B) DLD-1, (C). La migración fue calculada respecto a las condiciones control.

**La Figura 9.** Se muestra cómo el Raltegravir (RAL) inhibe la capacidad invasora de las células. (A) Porcentaje de invasión en células DLD-1 transfectadas con Fascina1 (pGFP frente a pGFP-FSC1). (B) Porcentaje de invasión en células HCT 116 no transfectadas.  
30 (C) Niveles de ARNm de Fascina1 en células DLD-1 transfectadas.

**Figura 10.** Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra cuando se trataron con Raltegravir y Migrastatina en el medio E3 (A) y cuando fueron inyectadas con HCT-116 o líneas de células tumorales DLD-1 transfectadas con Fascina1 (B). Las células DLD-1 fueron previamente transfectadas para aumentar la expresión de Fascina1.

5 **Figura 11.** Ensayos de invasión de pez cebra 4 días después del xenoinjerto. (A) Las imágenes muestran las células invasivas y no invasivas en un modelo de pez cebra. En el panel derecho, se muestra la capacidad de invasión de cada línea celular. (B) Se inyectaron células cancerígenas HCT-116 en larvas de pez cebra y luego se trataron con Migrastatina y Raltegravir. El efecto de Raltegravir en la disminución del porcentaje de invasión celular y el número de focos de invasión es similar al de la Migrastatina. (C) Efecto de los fármacos sobre la media del porcentaje de larvas de pez cebra con invasión en células DLD-1 transfectadas con Fascina1. (D) Efecto de los fármacos sobre el número de focos de invasión en células DLD-1 transfectadas con Fascina1. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE; en comparación con el control, \*  $p = 0,049-0,01$ . \*\*  $p = 0,001-0,009$ . \*\*\*  $p = 0,0001-0,0009$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

20 **Figura 12** Potencial anti-metastásico de RAL en pez cebra. (A) Seis días después de la inyección, se examinaron las larvas para evaluar si la micrometástasis se desarrollaba al invadir las células HCT 116 nativas y DLD-1 transfectadas. (B) Los criterios de evaluación fueron la presencia de colonias de células cancerosas humanas (flechas) fuera del saco vitelino. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE; en comparación con la condición de control, \*  $p = 0,049-0,01$ . \*\*  $p = 0,001-0,009$ . \*\*\*  $p = 0,0001-0,0009$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## Ejemplos

Con el objetivo de encontrar nuevos compuestos anti-Fascina1, llevamos a cabo un cribado *in silico* de una biblioteca de compuestos seleccionados por su potencial para unirse a Fascina1, que posteriormente fueron evaluadas *in vivo* mediante un ensayo físico-químico para determinar su interacción real con la Fascina1. Los compuestos que se unen a Fascina1 fueron probados en líneas de células colorrectales para determinar su actividad para inhibir tanto la formación de lamelipodios como la formación de haces actina. Posteriormente, se realizaron ensayos de migración e invasión utilizando líneas celulares de cáncer colorrectal con el fin de probar si el grado de invasión se veía afectado por el tratamiento con inhibidores de Fascina1. Finalmente, se utilizó un modelo *in vivo* en larvas de pez cebra para evaluar la invasión tumoral. Todos estos experimentos que se explican a continuación confirman que el Raltegravir es un compuesto capaz de unirse a la Fascina1 y con efectos antimigratorios y antiinvasivos tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Dado que el Raltegravir se une directamente a la Fascina1 y los efectos antitumorales del Raltegravir son dependientes de Fascina1, confirmamos que su acción terapéutica se debe a esta interacción. Como la Fascina1 se sobreexpresa en otros tipos de cáncer también asociados con mal pronóstico, como el carcinoma de mama triple negativo y el cáncer de pulmón, Raltegravir tendrá un efecto beneficioso en otros tipos de tumores además del cáncer colorrectal, como el cáncer de mama triple negativo (Rodríguez-Pinilla, et al 2006) y cáncer de pulmón no microcítico (Zhang et al, 2018).

### *Cribado Virtual*

Se aplicaron técnicas de cribado virtual o *virtual screening* (VS) para identificar compuestos capaces de inhibir con mayor eficacia la Fascina1 que la migrastatina. Se aplicaron cálculos de VS basados en acoplamiento molecular utilizando AutodockVina



para proponer compuestos aprobados por la FDA como inhibidores de la Fascina1. Para ello, se extrajo el modelo estructural de la Fascina1 de la estructura cristalina del banco de datos de proteínas (PDB) con el código 6B0T y se convirtió a formato PDBQT con MGLTOOLS (<http://mgltools.scripps.edu>) utilizando parámetros predeterminados. El

5 ligando co-cristalizado con la Fascina1 en 6B0T (NP-G2-029, compuesto G2) también se convirtió al formato PDBQT. A continuación, este modelo de proteína se examinó con AutodockVina frente a un subconjunto de compuestos de la biblioteca DrugBank (versión 5.0; de 9591 compuestos, incluidos 2037 aprobados por la FDA estadounidense, 96 nutracéuticos y 6000 experimentales) y el compuesto NP-G2-029.

10 Una vez finalizados los cálculos de *Virtual screening* (VS) anteriores, se seleccionaron los 20 compuestos principales en función a su acoplamiento. En este listado se detectó NP-G2-029. A continuación, y después de la inspección visual de los acoplamientos resultantes para estos compuestos, priorizamos los ligandos que compartían el resto del anillo aromático halogenado de NP-G2-029 y las interacciones clave que establece con

15 los residuos vecinos, específicamente el apilamiento pi-pi con TRP101 e interacciones hidrofóbicas con VAL134. Por lo tanto, seleccionamos al Raltegravir (código de DrugBank DB06817) siguiendo este criterio, y luego realizamos la Dinámica Molecular (MD) para estos dos complejos proteína-ligando con el fin de estudiar la evolución dinámica de estos complejos y verificar la estabilidad de los ligandos en el sitio de unión.

20 Las simulaciones de MD se realizaron con la versión GPU de Desmond incluida en la suite Maestro 2019.4 (Schrödinger LLC), en un servidor con una NVIDIA QUADRO PRO 5000. Los complejos se solvataron en un ambiente acuoso en una caja cúbica con una distancia mínima de 10 Å entre cada ligando y el límite de la caja (para condiciones de límite periódicas). Posteriormente, los sistemas se neutralizaron en NaCl 0,15 M y se

25 emplearon el campo de fuerza OPLS3 y los modelos de agua TIP3P-TIP4P [29] (REF mark nilsson). Inicialmente, los sistemas se configuraron en el conjunto NPT y la presión se controló mediante la metodología Martyna-Tobias-Klein, y se empleó el termostato Nose-Hoover para mantener el sistema cerca de 310K. Las trayectorias MD de producción se ampliaron a 100 nanosegundos (ns) por sistema. Las trayectorias de MD

30 resultantes se analizaron en términos de interacciones proteína-ligando promediadas a lo largo del tiempo y también en términos de la desviación cuadrática media (RMSD) de las fluctuaciones.

Ambos complejos producen valores de fluctuación de RMSD inferiores a 4 Å, lo que implica la estabilidad de ambos ligandos en el sitio de unión a Fascina. En la figura A,

ambos gráficos muestran las principales interacciones entre Fascina1 y G2 (arriba) y RAL (abajo), los residuos de aminoácidos más relevantes se encuentran en el eje X, mientras que el eje Y muestra la fracción de interacción. Estas interacciones se pueden clasificar por tipos y resumir, como se muestra en el gráfico anterior. Las interacciones proteína-ligando (o 'contactos') se clasifican en cuatro tipos: enlaces de hidrógeno, puentes hidrófobos, iónicos y de agua. Cada tipo de interacción contiene subtipos más específicos, que se pueden explorar a través del panel 'Diagrama de interacciones de simulación'. Los gráficos de barras apiladas se normalizan a lo largo de la trayectoria: por ejemplo, un valor de 0,7 sugiere que el 70% del tiempo de simulación se mantiene la interacción específica. Son posibles valores superiores a 1,0 ya que algunos residuos de proteínas pueden hacer múltiples contactos del mismo subtipo con el ligando. En ambos casos los residuos más relevantes son TRP-101 y VAL134. En la Figura 1B podemos observar una representación 2D de las interacciones proteína-ligando promediadas sobre las trayectorias de 100 ns, Fascina1 y G2 (izquierda) y Fascina1 y RAL (derecha). Ambos compuestos comparten patrones de interacción similares y el Raltegravir forma, además, una densa red de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua vecinas, lo que podría estar relacionado con un aumento de la estabilidad si lo comparamos con NP-G2-029. En general, los SV confirman que el Raltegravir interactúa directamente con la Fascina1 *in silico*, aunque la estructura química de esas moléculas es muy diferente, ver Fig. 1B.

#### *Titulación por termofluor y fluorescencia*

Los ensayos de Fluorimetría de Barrido Diferencial (Thermofluor) se realizaron usando un sistema de RT-PCR Biorad C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 en un formato de 96 pocillos. Se prepararon mezclas de reacción de 25  $\mu$ L que contenían Fascina1 2  $\mu$ M (Hypermol) en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y sacarosa al 5% a pH 7,4, en presencia de SYPRO Orange (dilución de 1000 veces del stock comercial (Invitrogen)). Los compuestos indicados, preparados a 10 mM en DMSO al 100%, se agregaron a cada pocillo hasta una concentración final de 1 mM y DMSO al 10%. Se realizaron tres repeticiones por compuesto junto con seis controles internos, que contenían solo proteína libre en DMSO al 10%. Las placas de PCR se taparon y posteriormente se agitaron, centrifugaron, incubaron durante 2 min a 20 °C dentro de la máquina de RT-PCR y se calentaron de 20 a 100 °C a una velocidad de barrido de 1°C / min. Se obtuvieron perfiles de desnaturalización registrando la intensidad de fluorescencia para los filtros predefinidos FAM, HEX y T-Red. Se utilizó la derivada de la curva de

fluorescencia para determinar la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>). Los cambios en la T<sub>m</sub> asociados a la unión del ligando se estimaron tomando la T<sub>m</sub> promedio valor derivado de los controles internos de proteína libre. La Fascina1 se dializó con el tampón apropiado antes de cada experimento de titulación. La concentración de Fascina1 se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 67840 cm<sup>-1</sup> · M<sup>-1</sup>.

Los experimentos de titulación de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Inc.). Se valoró una solución de Fascina1 15 μM (14,7 μM) con cada compuesto añadiendo volúmenes crecientes de soluciones concentradas. Los espectros de emisión se registraron entre 307 y 500 nm a 25 °C en DMSO al 10%, NaCl 100 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4, con la longitud de onda de excitación fijada en 280 nm. Las isotermas de unión se generaron usando los cambios en el área espectral y se ajustaron usando ORIGIN 7.0 (Microcal Inc.) a un modelo de unión de equilibrio de un sitio, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$F = F_f + (F_b - F_f) \cdot \frac{(P_T + L_T + K_d) - \sqrt{(P_T + L_T + K_d)^2 - 4P_T \cdot L_T}}{2P_T}$$

Donde F<sub>f</sub> y F<sub>b</sub> son la señal de fluorescencia de Fascina1 libre y unida y P<sub>T</sub> y L<sub>T</sub> son la concentración total de proteína y ligando, respectivamente, en cada punto de adición.

Los resultados se resumen en la Figura 2. El perfil de despliegue térmico de la proteína, sola o en presencia del ligando salvaje, se controló siguiendo la señal de fluorescencia de Sypro Orange, un tinte hidrofóbico que aumenta su señal de fluorescencia al unirse a los parches hidrofóbicos que quedan expuestos a medida que se desarrolla la proteína. La unión del ligando aumenta la T<sub>m</sub> de la transición de despliegue en una cantidad proporcional a la afinidad de unión del ligando.

Como se mostró anteriormente (Albuquerque et al, 2020), a pH 7,4, la Fascina1 se despliega en una sola transición, sin mostrar dependencia de la concentración y con buena tolerancia al DMSO. Se probó la unión de Raltegravir a Fascina1 2 μM a una concentración final de 1 mM en DMSO al 10%, lo que induce una estabilización moderada de la proteína, indicativa de una interacción débil a moderada con Fascina1. La unión de Raltegravir a Fascina1 se validó aún más *in vitro* mediante experimentos

de titulación de fluorescencia, lo que genera una constante de disociación en el rango microMolar alto ( $K_d = 180 \pm 10 \mu\text{M}$ ). La constante de disociación del Raltegravir es ligeramente más baja que la de la Imipramina  $K_d$ , lo que significa que se une a Fascina1 con mayor afinidad que la Imipramina (Albuquerque et al, 2020). Por lo tanto,

5 Raltegravir es un mejor inhibidor de Fascina1 que la Imipramina.

#### *RMN de interacción por ligando*

La interacción entre el Raltegravir y la Fascina1 recombinante se confirmó además mediante métodos de espectroscopía de RMN basados en ligandos. Se llevaron a cabo experimentos de RMN de diferencia de transferencia de saturación (DTS) y

10 WaterLOGSY (WL), que permiten la evaluación directa de la interacción ligando-proteína en solución y se utilizan a menudo en cribados de alto rendimiento gracias a su tiempo de adquisición relativamente rápido. Ambos experimentos muestran los cambios de intensidad en las resonancias de ligandos causados por la transferencia de magnetización mediada por el efecto nuclear Overhauser (NOE), como consecuencia de la interacción con la proteína diana. En el experimento DTS, se registran dos

15 espectros de RMN de  $^1\text{H}$  después del pulso de saturación selectiva de proteína con o sin resonancia, respectivamente, y se calcula el espectro de diferencia. La interacción ligando-proteína se reconoce por la presencia de señales positivas en el espectro de RMN de diferencia, mientras que la falta de interacción (por ejemplo, en una muestra de control en ausencia de proteína) no produce señales. En el experimento de WL, la

20 magnetización de agua se transfiere parcialmente al ligando en el estado unido a proteína, que luego se intercambia rápidamente con el ligando libre. Un compuesto que no interactúa da como resultado resonancias positivas, mientras que las interacciones proteína-ligando se caracterizan por señales negativas o por señales positivas que disminuyen en intensidad con respecto a la muestra de control. Los experimentos de

25 RMN anteriores realizados con Raltegravir en presencia de Fascina1 muestran claramente una interacción (Figura 3). Específicamente, se detectaron señales aromáticas positivas (ver el recuadro en la Figura 3a) en el espectro DTS de la mezcla, mientras que estaban ausentes en el espectro control sin Fascina1 (Figura 3b), y en el espectro WL las mismas señales disminuyeron en intensidad en comparación con el

30 control sin Fascina1 (Figura 3c). En las Figuras 3b y 3c se puede observar que los picos a 7.0-1.1 y 17.3-7.4  $\delta$  [ $^1\text{H}$ ] ppm (partes por millón) solo están presentes cuando se

analiza el complejo Fascina1-Raltegravir, no cuando el Raltegravir se analizó solo. Los datos de RMN confirman que el Raltegravir interactúa directamente con la Fascina1 en solución.

#### *Microscopía electrónica de transmisión*

- 5 Se evaluó la microscopía electrónica de transmisión (MET), siguiendo la metodología previa de Jansen et al. 2011 (Jansen et al., 2011). Se polimerizó actina purificada (21  $\mu$ M) de acuerdo con el protocolo de *Actin Binding Protein BiochemKit TM Muscle Actin* (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EE. UU.). Se incubó con la actina con Fascina1 recombinante humana (Hypermol, Bielefeld, Alemania) (molar relación 1: 1) durante 30
- 10 min a temperatura ambiente. La Fascina1 se incubó previamente durante 2 horas a temperatura ambiente con dimetilsulfóxido al 0,1% (DMSO, control), G2 10  $\mu$ M o RAL 30  $\mu$ M. Las muestras se adsorbieron directamente en rejillas de cobre de malla 200 durante 30 segundos, se secaron para eliminar el exceso de solución, se lavaron dos veces con agua destilada y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 1% (p /
- 15 v) durante 30 segundos y se secaron nuevamente. El estudio de MET de los filamentos de actina y los haces de Fascina1-actina se realizó en un microscopio electrónico de transmisión PHILIPS TECNAI 12 (Osaka, Japón) a un voltaje de aceleración de 80 kV y un aumento de hasta 135.000X. Las imágenes se capturaron en una cámara de dispositivo acoplada (Megaview III). Los números de filamentos se contaron
- 20 manualmente en 20 imágenes / condición y se analizaron estadísticamente (prueba de Kruskal-Wallis).

La microscopía electrónica de transmisión mostró (Figura 4) que solo la F-actina polimerizada incubada en presencia de Fascina1 podía formar haces de filamentos. La Fascina1 preincubada con 10  $\mu$ M G2 y 30  $\mu$ M RAL, provocó la desorganización de los

25 haces, lo que resultó en un número menor de filamentos que en las condiciones de control. Aunque ambos compuestos presentan una desorganización del haz similar, la ventaja del descubrimiento de Raltegravir como inhibidor de los haces de actina reside en que se trata de un fármaco aprobado por la FDA y, por tanto, un fármaco seguro.

#### *Cultivo de células*

- 30 Se adquirieron ocho líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD): SW480, DLD1, HCT 15, HCT116, HT-29, LST174, SW620 y LOVO. Las líneas celulares se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM) que contenía

suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10%, penicilina 50 U / ml y estreptomicina 50 µg / ml (Sigma Aldrich Chemical Co., EE. UU.) En un atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humidificado a 37 ° C. El subcultivo se realizó cuando se obtuvo una confluencia del 90%. La expresión del gen de la Fascina1 se midió siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Conesa-Zamora et al, 2013). El ARN se extrajo tratando sedimentos de líneas celulares de unas 200.000 células con 700 µl de Qiazol (Qiagen ref: 1023537) y añadiendo 140 µl de cloroformo y centrifugando a 12.000 g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa que contenía 350 µl se sometió a una extracción automática de ARN total utilizando el equipo Qiacube y el miRNeasy Mini Kit (ref: 217004), ambos proporcionados por Qiagen. El cDNA se obtuvo usando el kit de síntesis de cDNA Maxima First Strand para RT-qPCR de Thermo Fisher (nº de cat. K1671) siguiendo la información del fabricante. Se añadieron cinco microlitros de ADNc diluido 1: 5 a la reacción de qPCR que contenía 12,5 µl del kit de PCR 2X QuantiTect SYBR Green (ref: 204145) de Qiagen y 300 nM de cada cebador en un volumen total de 25 µl. La qPCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real 7500F por Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.) según el manual de instrucciones y siguiendo el protocolo estándar: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C 15 seg, 60°C 1 min y una etapa de curva de fusión que consta de 95°C 15 seg, 60°C min, 95°C 30 seg y 60°C 30 seg. La cuantificación relativa se realizó mediante el método 2-ΔCt utilizando β-actina como gen de referencia. Las cantidades de ARNm se dan como número de copias por millón de copias de β-actina. Los cebadores de β-actina utilizados para la cuantificación de Fascina1 fueron 115F y 116R, mientras que los de HPCA y DAG1 fueron b-a-blgF y b-a-blgR.

Las secuencias de cebadores utilizadas para la validación cuantitativa por PCR para Fascina1 (ENSG00000075618) y β-actina (ENSG00000075624) se enumeran en Conesa-Zamora. P 2013 Información complementaria S1. Los resultados se pueden observar en la Figura 5 y la Tabla 1.

## REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de Fascina1 para su uso en un método de tratamiento para el cáncer, en el que se trata a pacientes con cáncer en el que se detecta Fascina1 en, al menos, el 10% de las células cancerosas de una muestra obtenida del paciente, siendo dicho inhibidor Raltegravir.

5 2. El Inhibidor de Fascina1 según la reivindicación anterior, en el que la Fascina1 se detecta mediante inmunohistoquímica en la muestra obtenida del paciente.

3. El inhibidor de Fascin1 según la reivindicación anterior, en el que la muestra obtenida del paciente es una muestra de fluido corporal o una muestra de biopsia sólida.

10

4. El inhibidor de Fascina1 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer tiene un origen a partir de tejidos derivados del ectodermo o endodermo.

15 5. El inhibidor de Fascina1 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer colorrectal, carcinoma de mama triple negativo y cáncer de pulmón no microcítico, preferiblemente cáncer colorrectal.

6. El inhibidor de Fascina1 según la reivindicación anterior, en el que el cáncer colorrectal es un adenocarcinoma serrado.

20

7. El inhibidor de Fascina1 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento del cáncer es la supresión de la colonización metastásica.

25 8. El inhibidor de Fascina1 según la reivindicación anterior, en el que dicha supresión de la colonización metastásica comprende la supresión de la colonización metastásica en al menos un órgano como pulmón, hígado o ganglios linfáticos.

9. Una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de Fascina 1 descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores (de 1 a 8) para su uso en un método de tratamiento para el cáncer, en el que se trata a pacientes con cáncer en el que se detecta Fascina1 en, al menos, el 10% de las células cancerosas de una muestra obtenida del paciente, que comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

10. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que se administra a un paciente por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal.

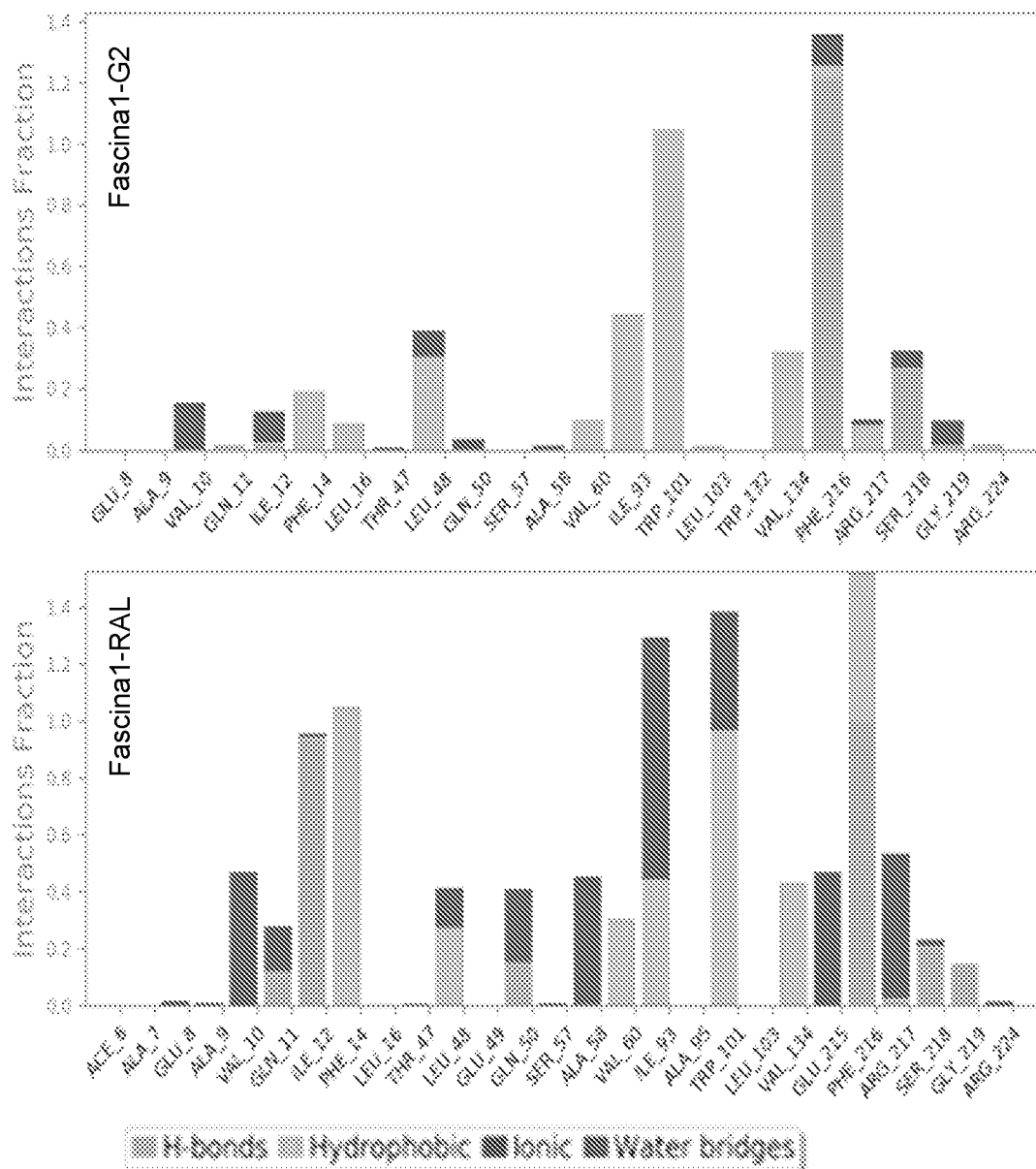
11. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 o 10, en la que además comprende un agente terapéutico adicional tal como 5-fluorouracilo, Oxaliplatino, Irinotecán, Capecitabina, Gemcitabina, Cetuximab, Taxol, Avastin, ácido folínico, Regorafenib, Zaltrap, inhibidores de la topoisomerasa I, NKTR-102,  
5 Tivantinib, PX-866, Sorafenib, Linifanib, inhibidores de la quinasa, Telatinib, XL281, Robatumumab e inhibidores de IGF1-R.

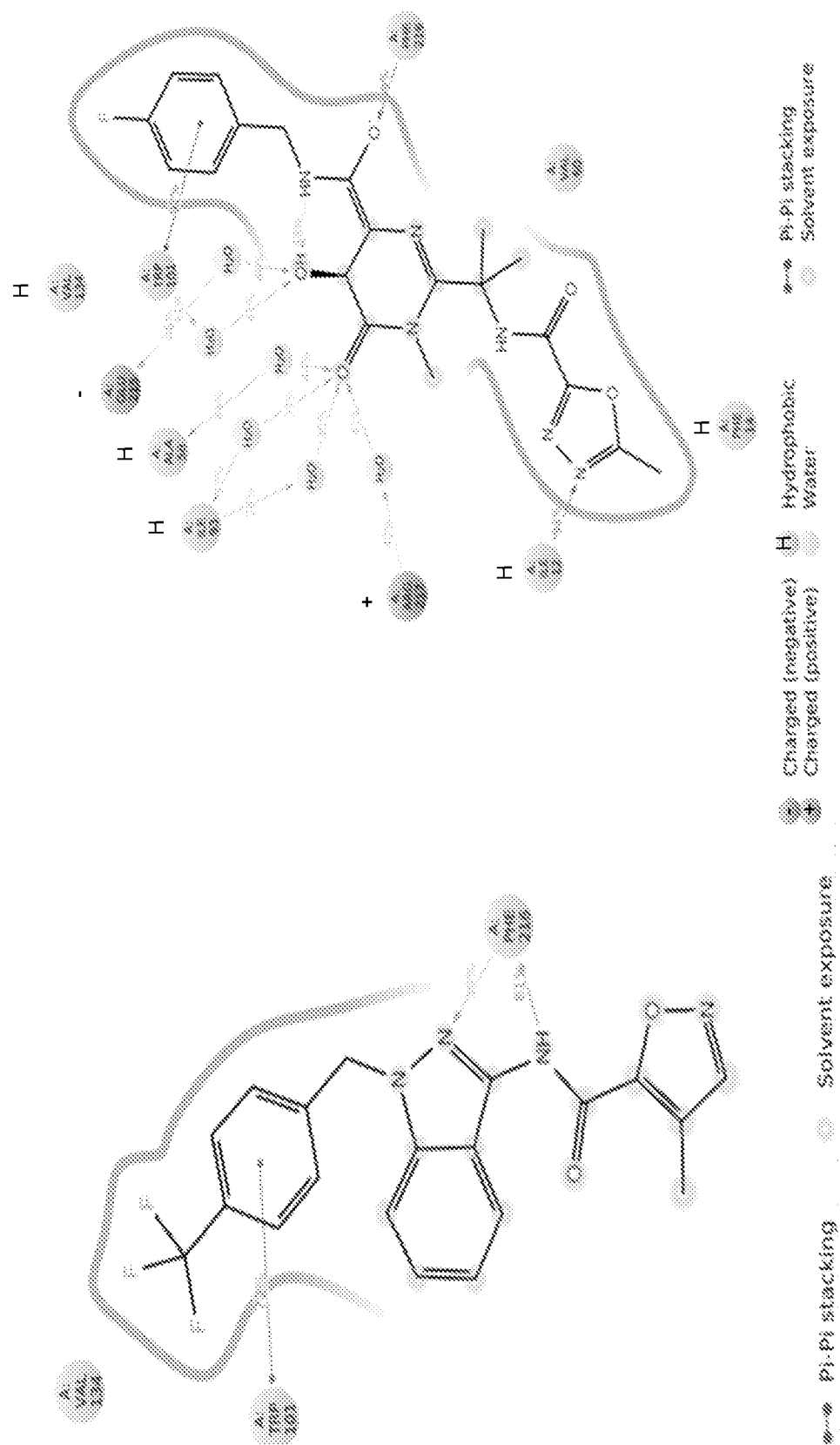
12. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 anteriores, que se administra como tratamiento posterior o simultáneamente con otras  
10 terapias.

13. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a 12 anteriores, en la que la dosis eficaz de raltegravir es de 0,0001 a aproximadamente 1000 mg / kg de peso corporal por día.



A





**Fig. 1**

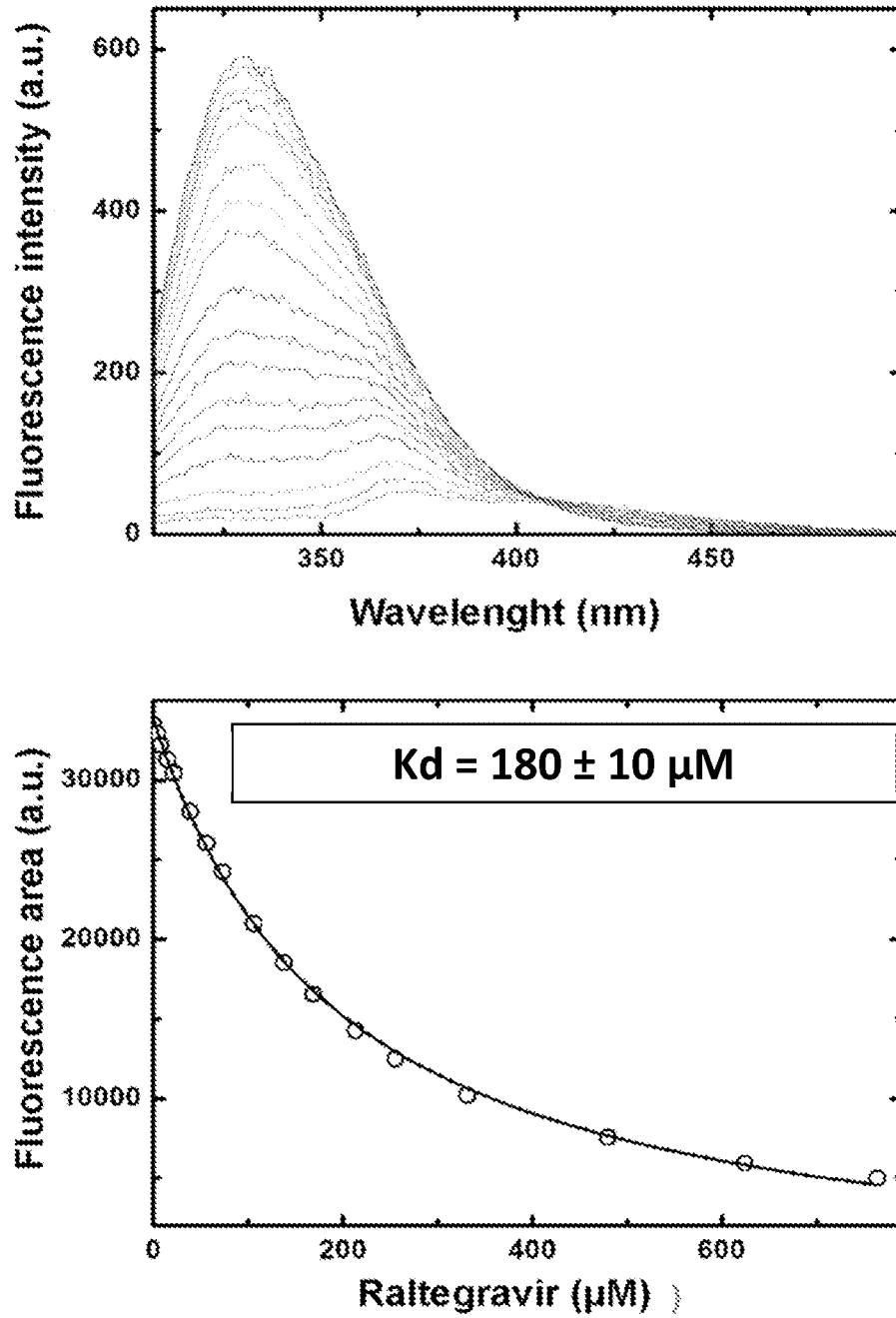


Fig.2

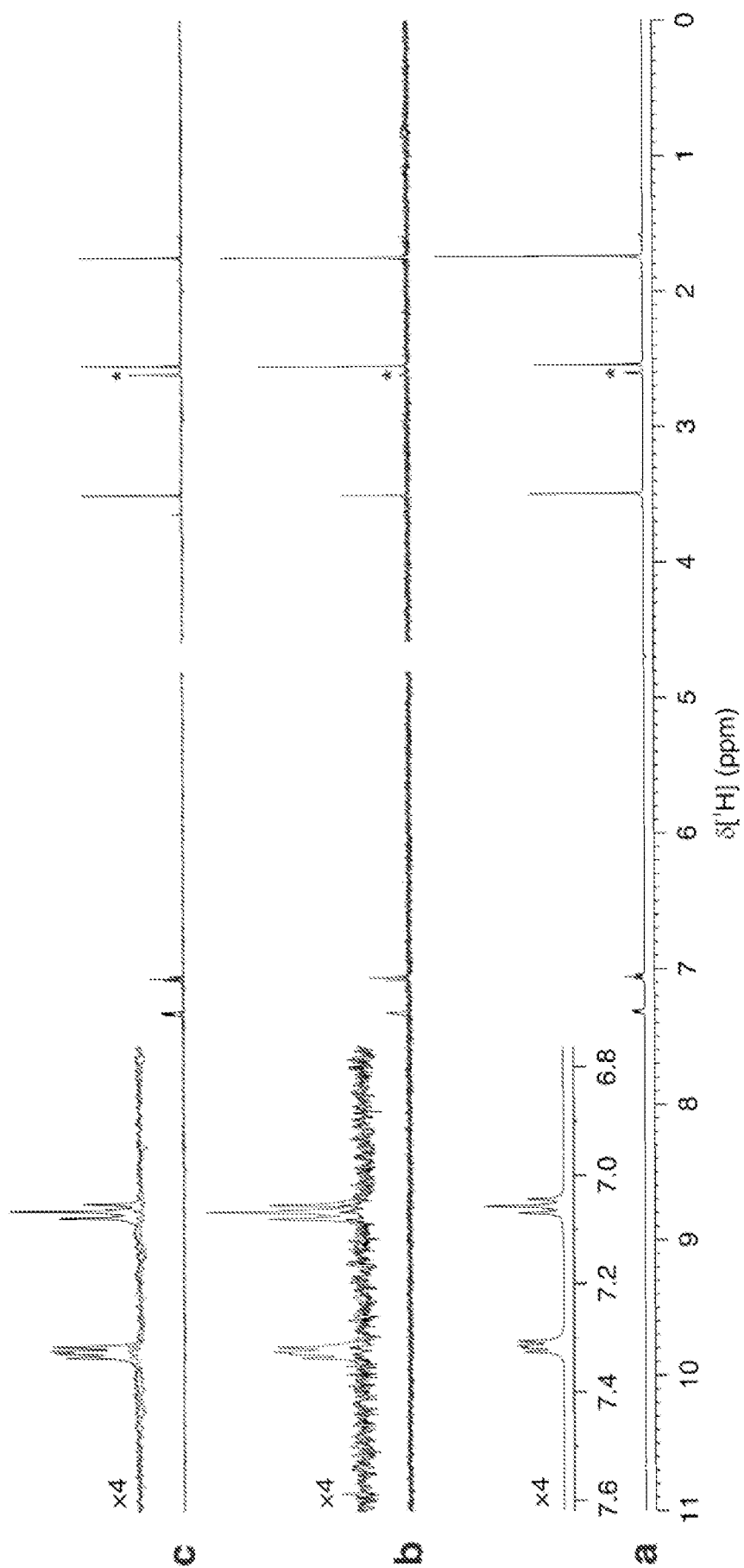
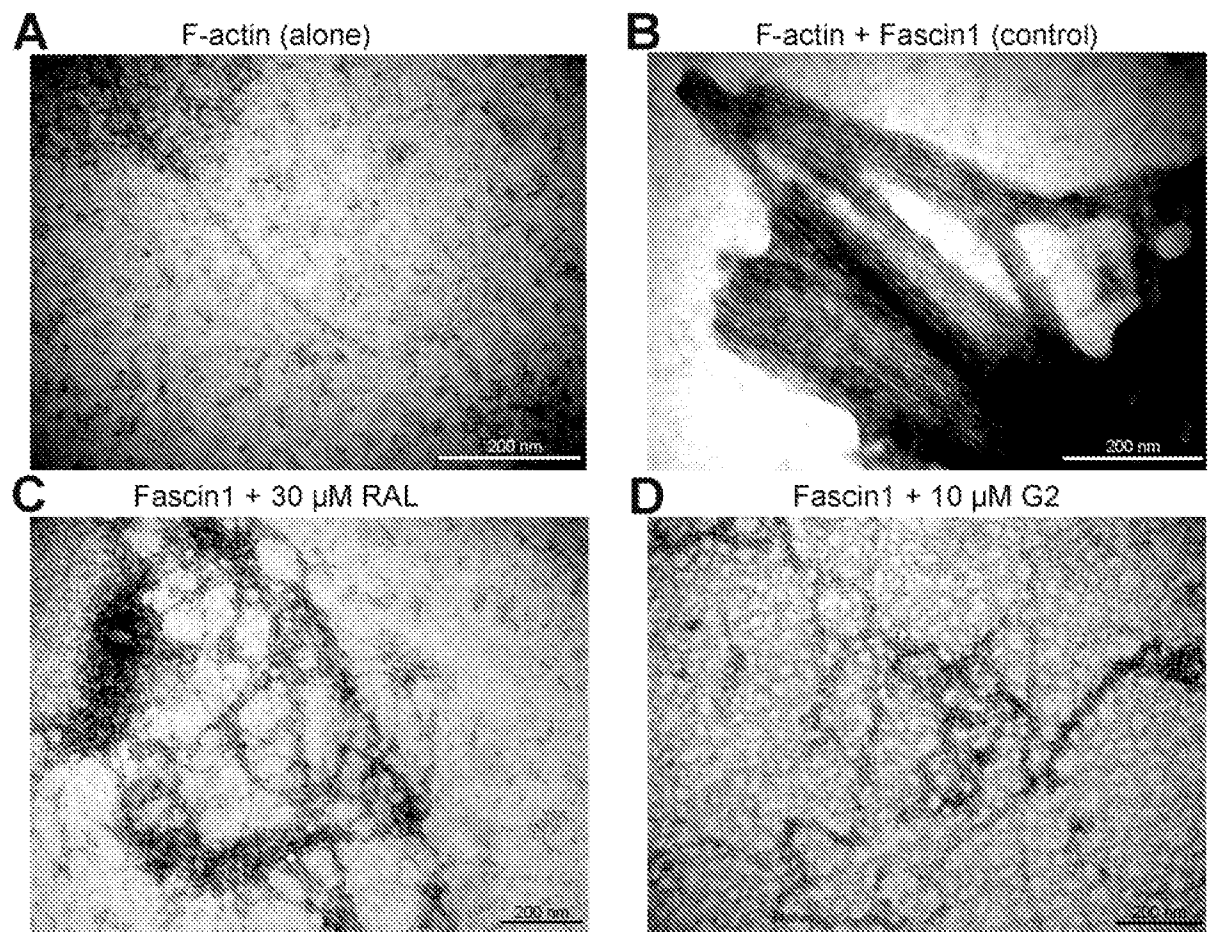
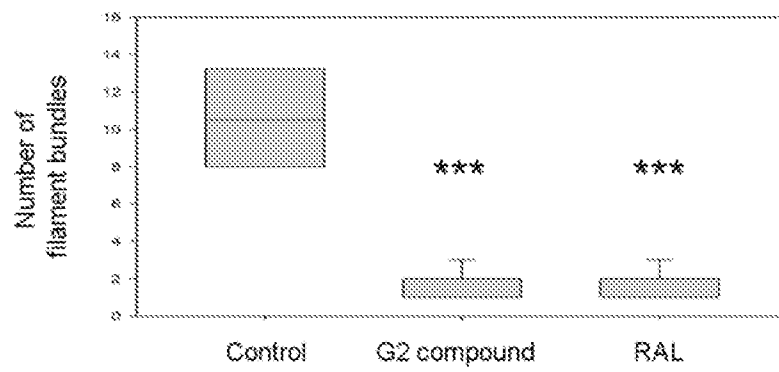


Fig.3



**E**



**Fig.4**

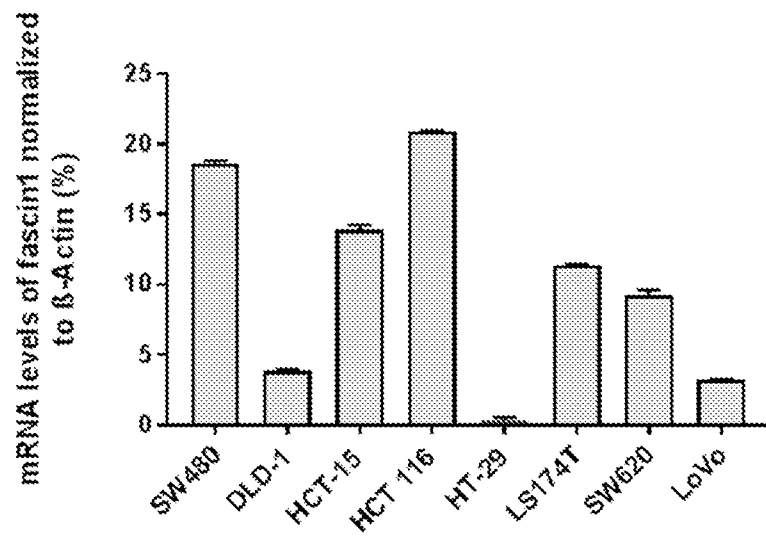
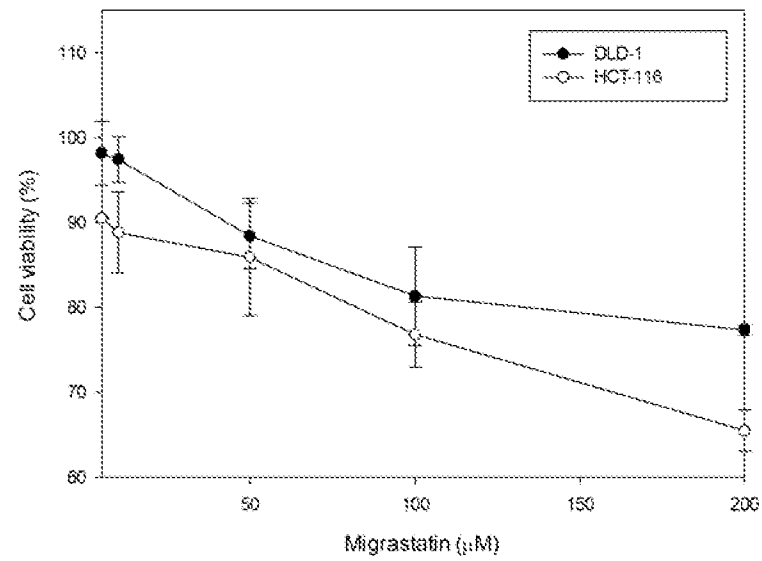
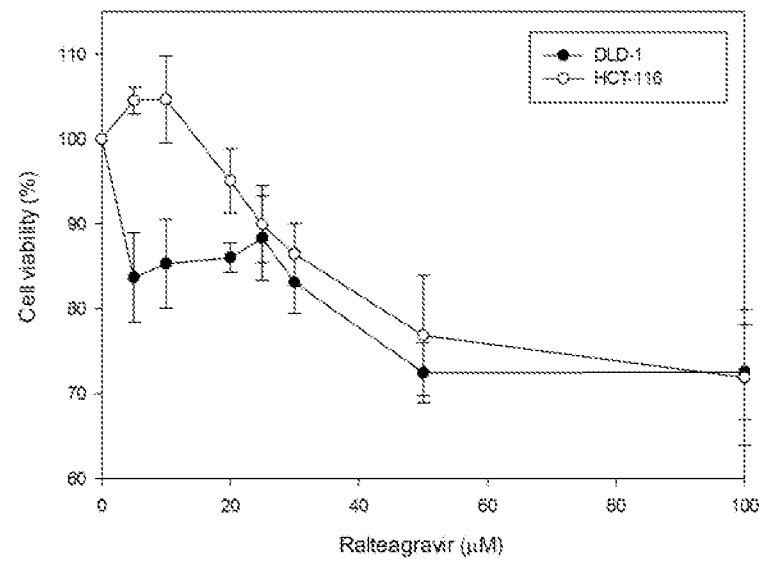


Fig.5

**A****B****Fig.6**

9/13

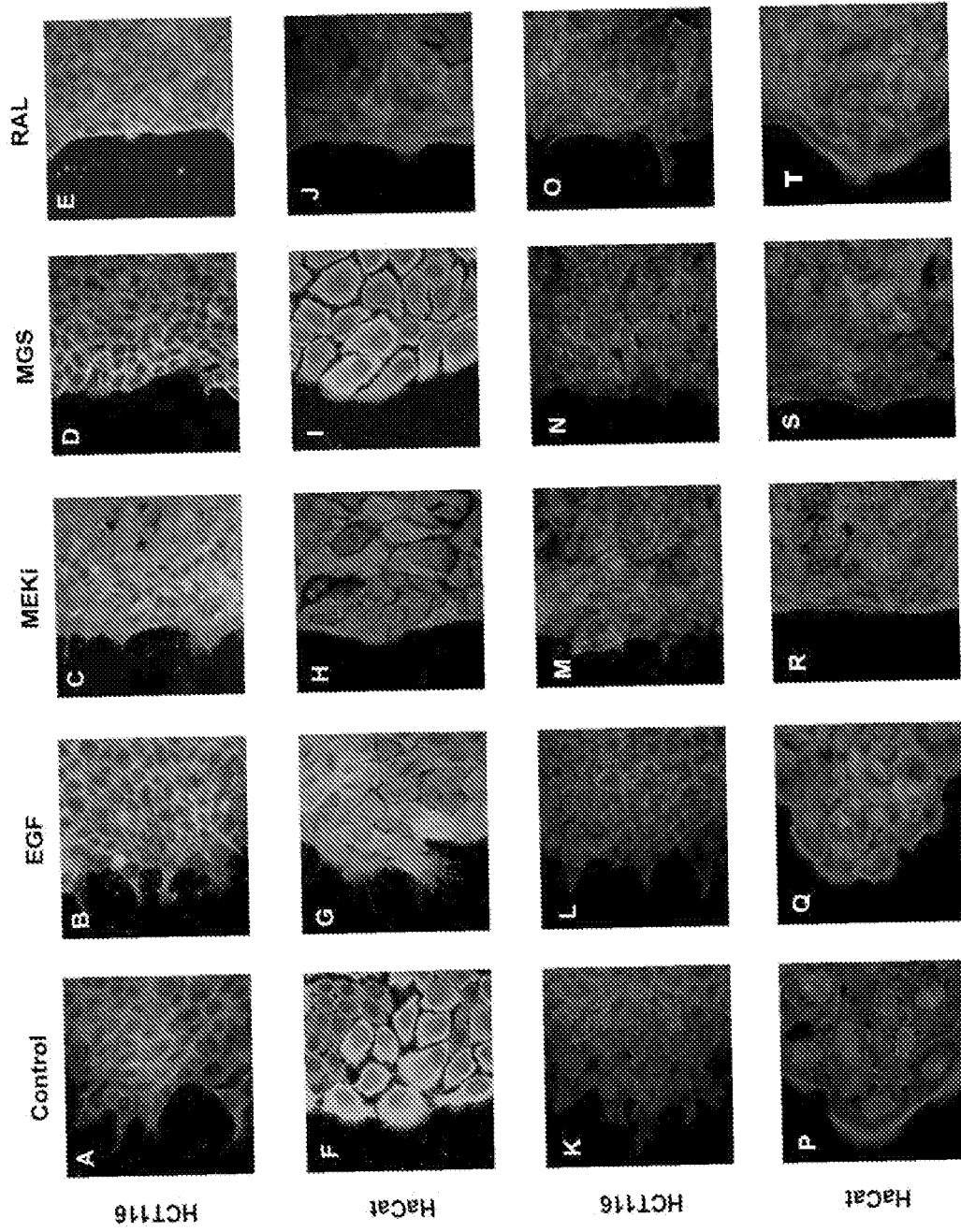


Fig. 7



9/13

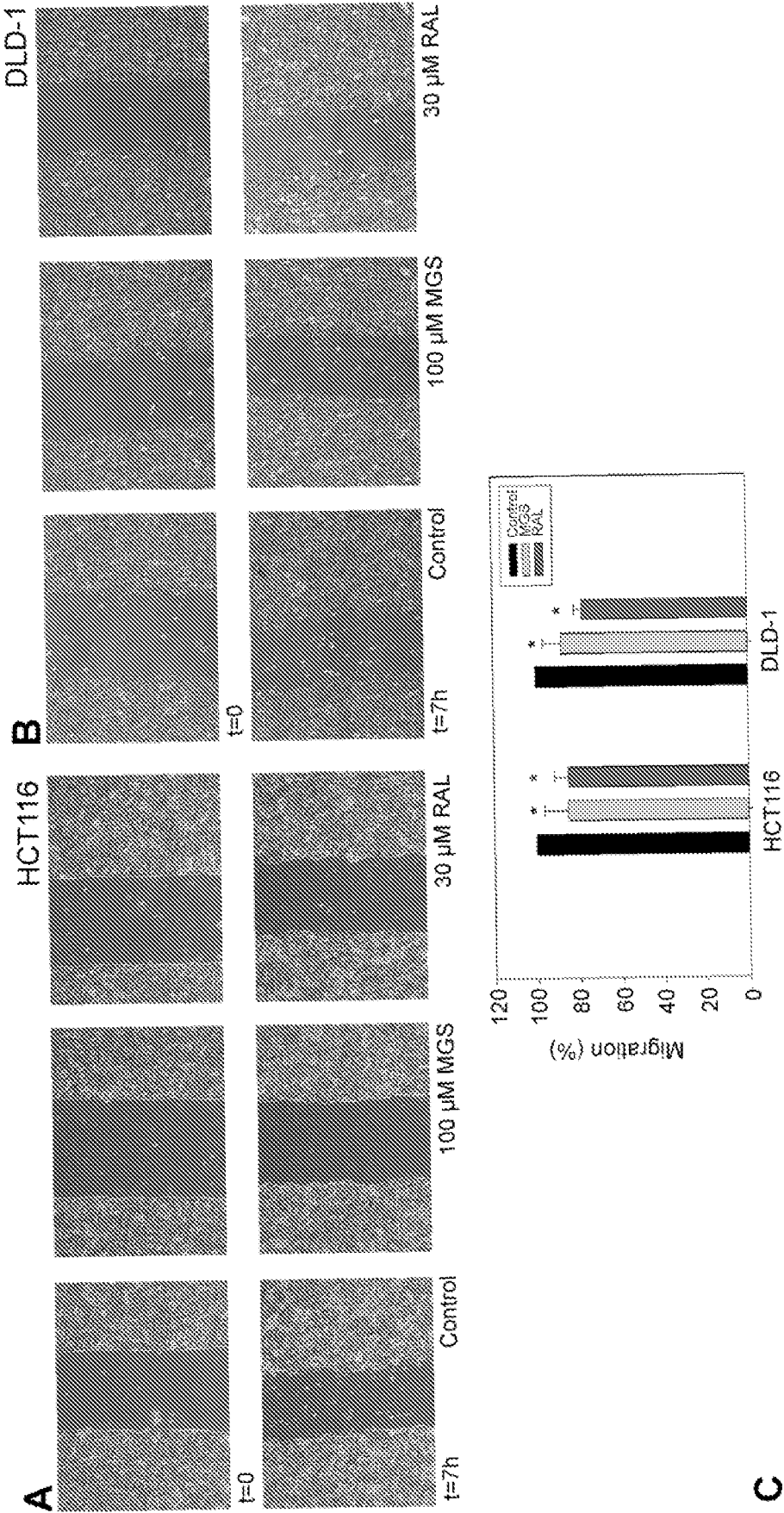


Fig.8

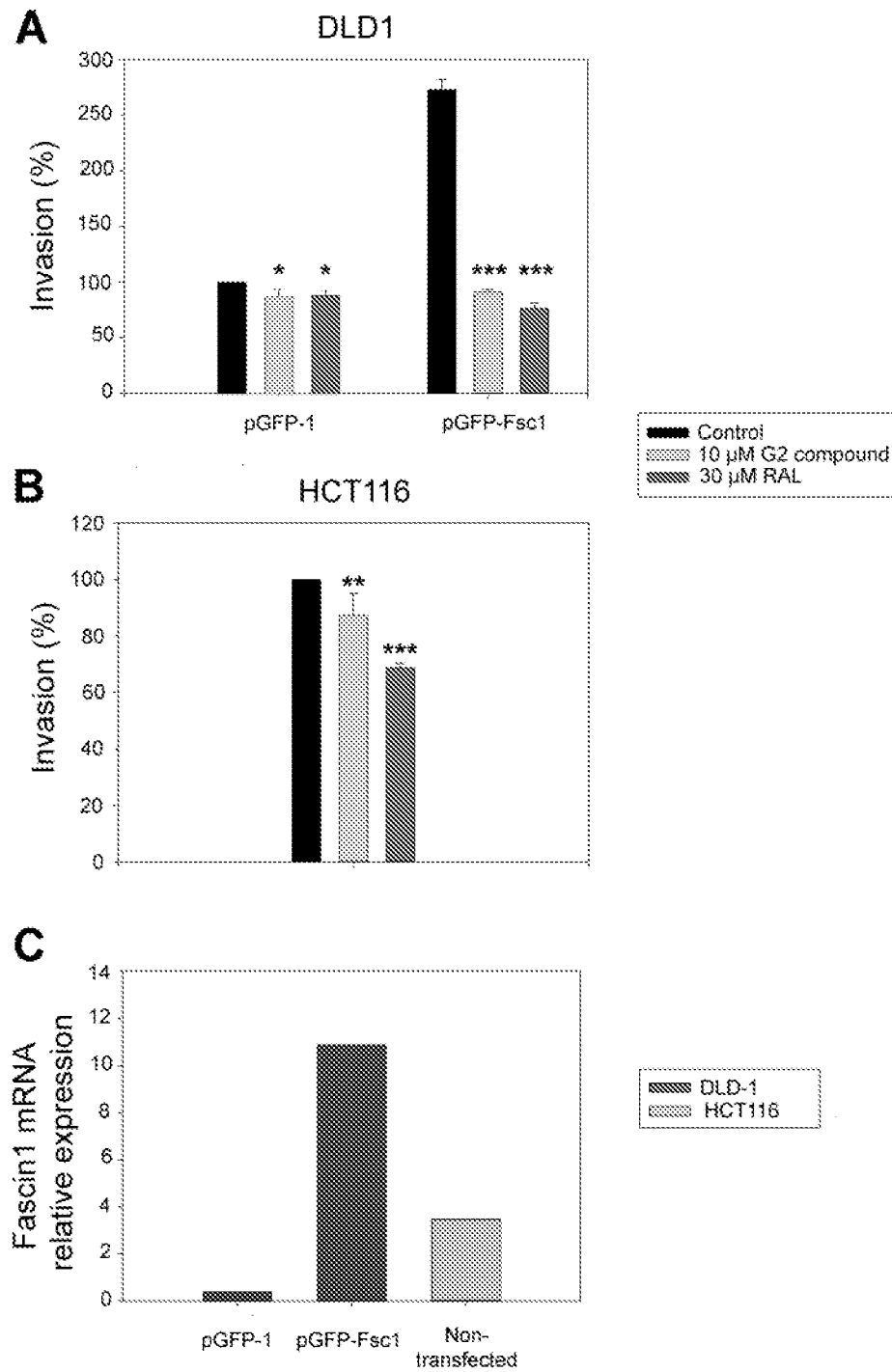


Fig. 9

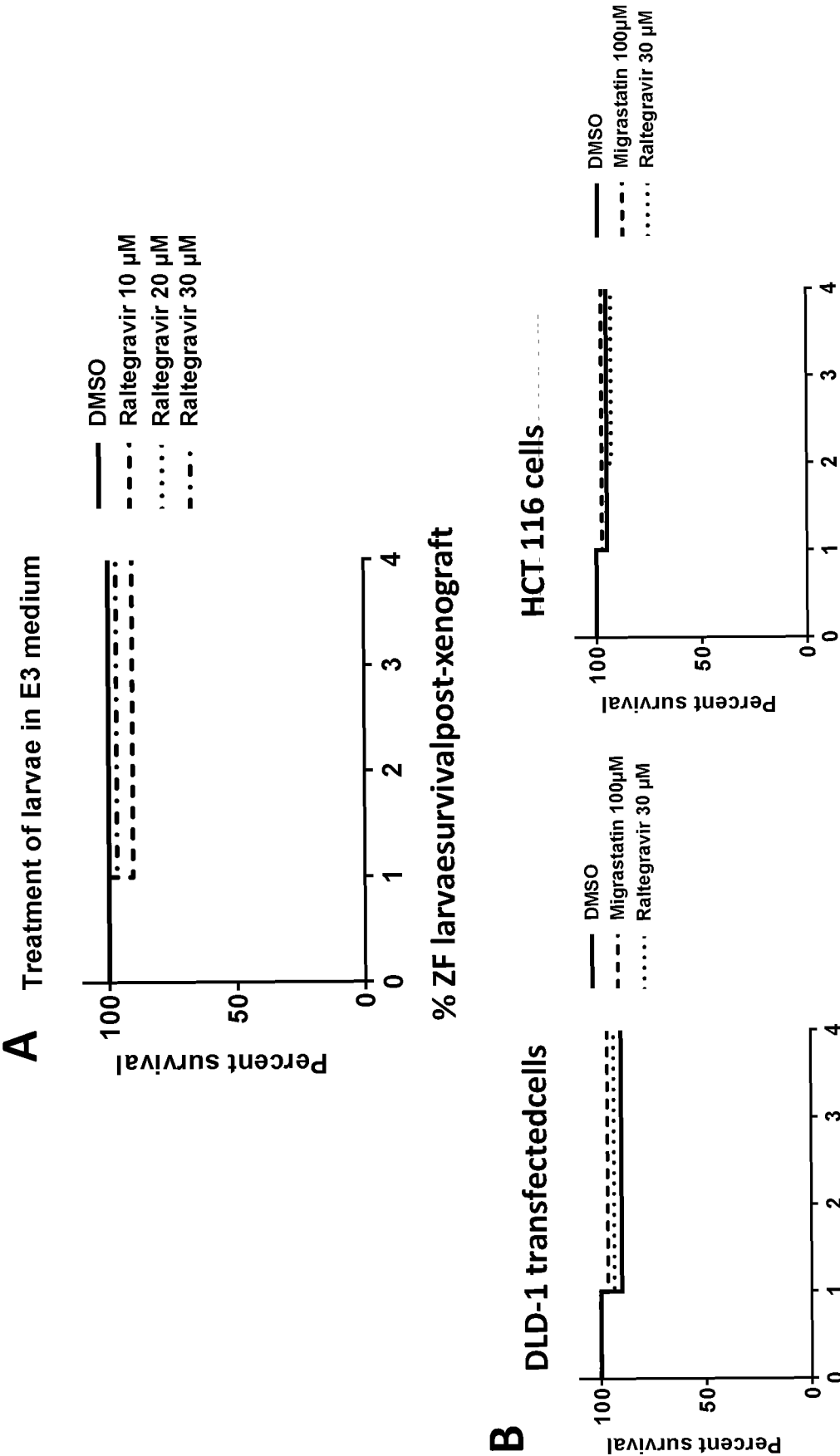


Fig.10

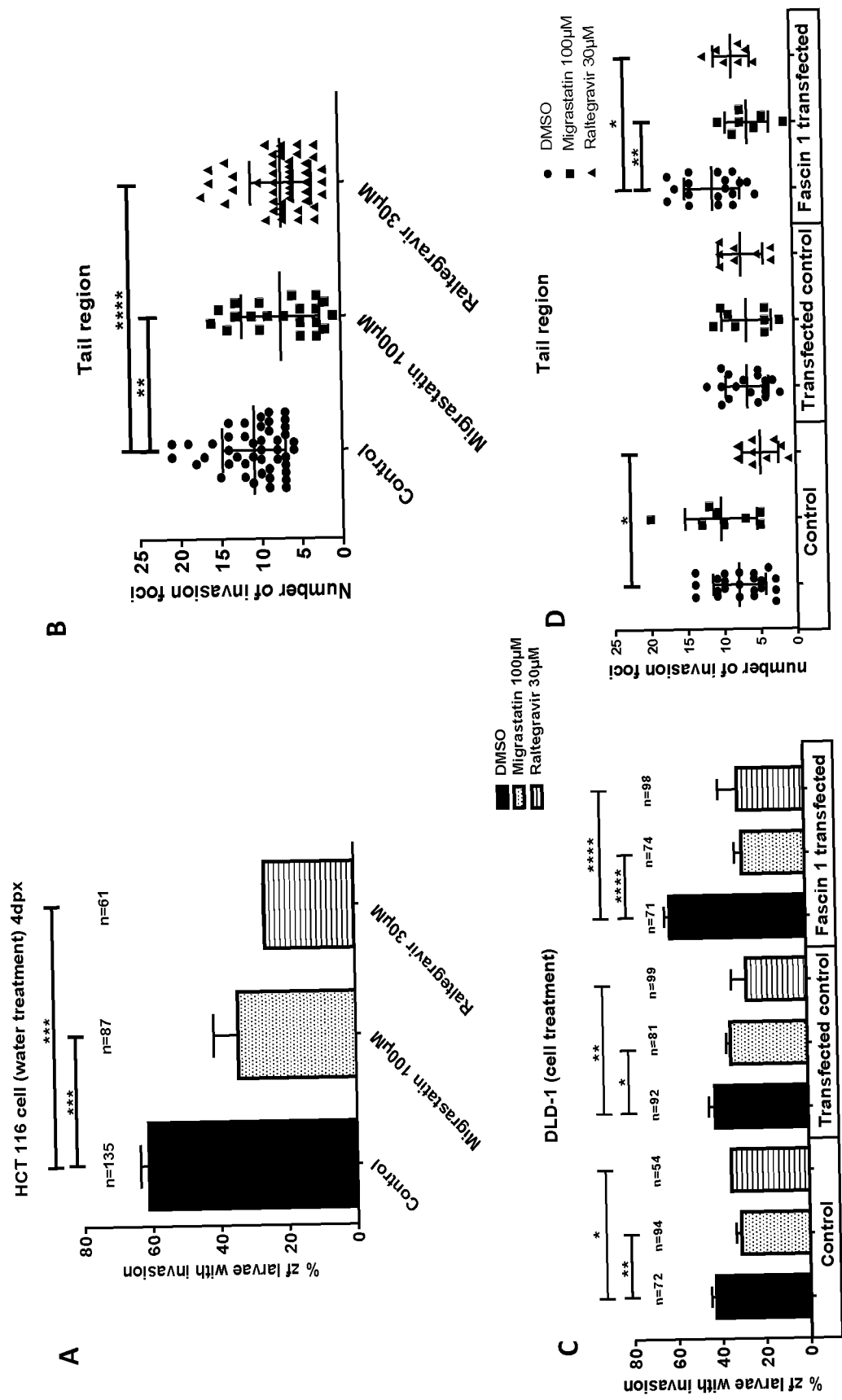


Fig.11

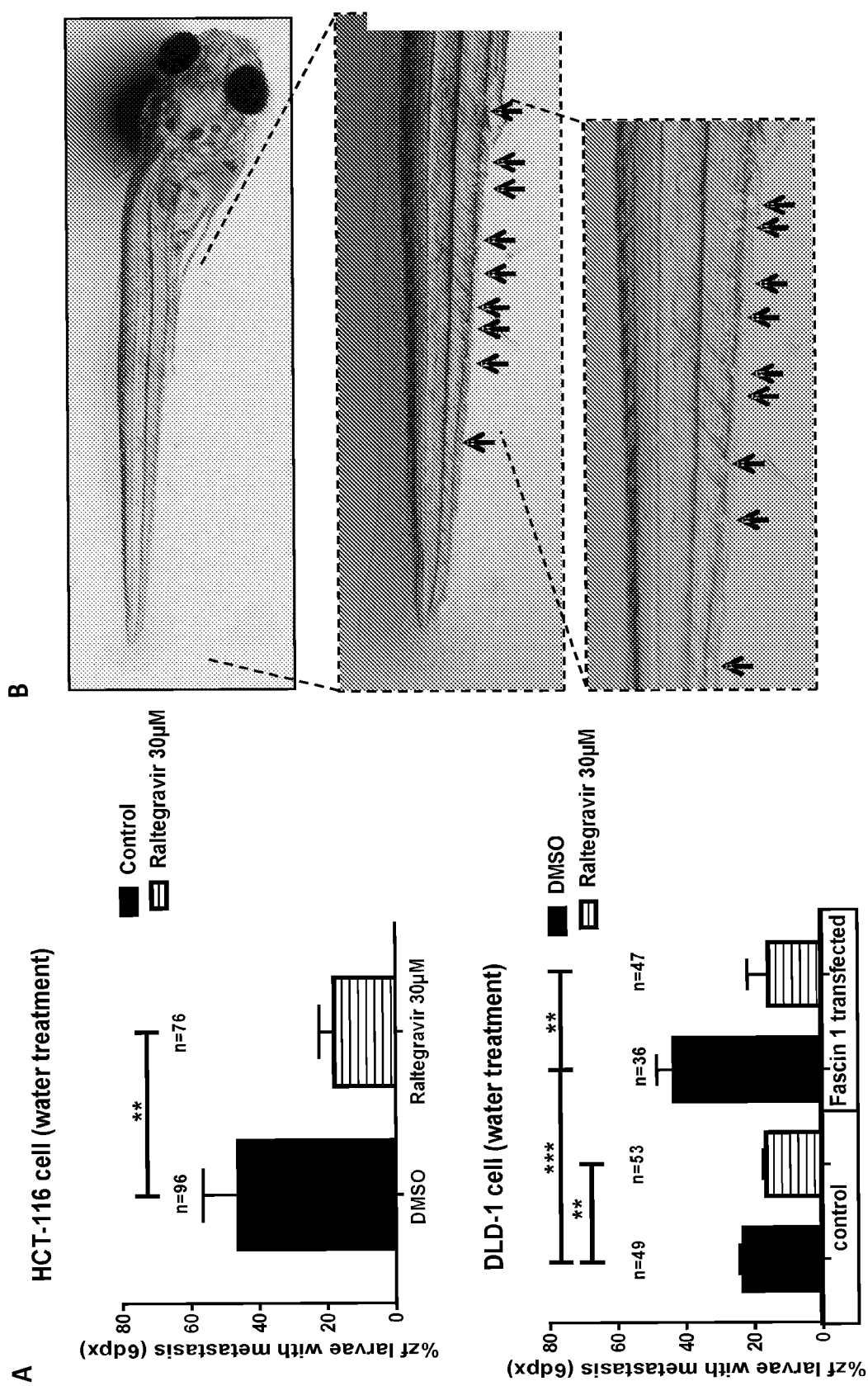


Fig.12