

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 732**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/10** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/4706** (2006.01)

**A61K 31/085** (2006.01)

**A61K 31/4965** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2018** **PCT/KR2018/001549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2018** **WO18147612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2018** **E 18750666 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 3572080**

54 Título: **Composición para inhibir la metástasis del cáncer y tratar el cáncer**

30 Prioridad:

**07.02.2017 KR 20170016587**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2025**

73 Titular/es:

**ONCOCROSS CO., LTD. (100.00%)**  
**15F 11 Saechang-ro, Mapo-gu**  
**Seoul 04168, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YI-RANG**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 996 732 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

Composición para inhibir la metástasis del cáncer y tratar el cáncer

5 [Campo técnico]

[0001] La presente invención se refiere a una composición para tratar el cáncer e inhibir la metástasis del cáncer, en la que el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares, mediante tratamiento con clorfenesina o carbamato de clorfenesina, opcionalmente en combinación con cloroquina o cloropirazina.

10

[Estado de la técnica anterior]

[0002] Una célula es la unidad más pequeña que constituye un cuerpo humano. Las células normales mantienen un número constante de células con su propia función reguladora, tal como el crecimiento, la división y la muerte celular. Si la célula se daña por una determinada causa, se repara para que sirva como una célula normal, o cuando la célula no se ha recuperado, muere por sí sola. Sin embargo, si se produce una mutación en las células normales debido a varias razones, esta mutación da como resultado células inmaduras que no regulan el ciclo celular. En consecuencia, la célula seguirá dividiéndose, lo que se define como cáncer. Además, las células cancerosas tienen características de que invaden y destruyen los tejidos u órganos circundantes, así como de propagarse a otras partes del cuerpo. El cáncer es la principal causa de muerte en Corea, y su tasa de mortalidad ha aumentado cada año. Aunque ha habido un progreso considerable en los tratamientos médicos para ciertos cánceres, la tasa de supervivencia a cinco años para todos los cánceres ha mejorado solo un 10 por ciento aproximadamente durante los últimos 20 años. Los cánceres o tumores malignos tienden a propagarse y crecer más rápidamente de forma descontrolada, por lo que es extremadamente difícil detectarlos y tratarlos a tiempo.

25

[0003] El intestino grueso (colon, intestino grueso) es un órgano digestivo largo en forma de tubo que conecta el intestino delgado (íleon) con el recto. El cáncer colorrectal se produce cuando se desarrollan crecimientos tumorales en esas partes. El cáncer colorrectal se divide en cánceres de colon y recto dependiendo de las partes donde se desarrollan los crecimientos tumorales. Los pacientes con cáncer colorrectal suelen tener síntomas, tales como un cambio en el hábito intestinal, heces con sangre o heces mucosas, heces estrechas, pérdida de peso, dolor abdominal, fatiga, inapetencia, etc. El cáncer colorrectal se propaga habitualmente al hígado o al pulmón, y aproximadamente más del 50 por ciento de los pacientes experimentan metástasis de cáncer. El cáncer colorrectal se trata mediante cirugía o radioterapia o quimioterapia dirigida o quimioterapia convencional. La inyección de cetuximab (Erbix) es una terapia dirigida representada para el cáncer colorrectal. Cetuximab es un anticuerpo monoclonal dirigido a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se une específicamente al EGFR en la superficie de las células de cáncer colorrectal para suprimir la proliferación general de las células cancerosas al inhibir un determinado proceso en la transducción de señales que provoca el crecimiento de las células cancerosas.

30

35

[0004] El cáncer de páncreas tiene la tasa de mortalidad más alta de todos los cánceres principales. En los EE. UU., más de 40 mil personas están diagnosticadas con cáncer de páncreas, y menos del 5 por ciento de ellas está viva cinco años o más después del diagnóstico. La baja tasa de supervivencia es atribuible al hecho de que la mayoría de los cánceres de páncreas a menudo son difíciles de diagnosticar hasta que se han propagado a los tejidos u órganos circundantes. Como los pacientes no presentan síntomas en una etapa temprana, y los síntomas son inespecíficos y variados en una etapa terminal, esto hace que sea más difícil diagnosticarlos temprano. Y las opciones de tratamiento para el cáncer de páncreas son limitadas. En una etapa temprana, el cáncer de páncreas se trata con cirugía y radioterapia. Sin embargo, las opciones no son efectivas para el cáncer de páncreas avanzado o recurrente. La gemcitabina, que se administra por infusión a través de una vena (por vía intravenosa, por IV), es eficaz una vez al día para tratar el cáncer de páncreas, y fue aprobada por la FDA en EE. UU. en 1998. La gemcitabina se usa más comúnmente en el tratamiento del cáncer de páncreas, que se combina con otros medicamentos, tales como el oxalato o el 5-FU (5-fluorouracilo). Pero ha tenido muy poco efecto en el aumento significativo de la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas. Para el tratamiento estándar de la quimioterapia convencional, la gemcitabina se administra sola (agente único) o se puede administrar junto (quimioterapia combinada) con erlotinib, un inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR. Las opciones alternativas son la combinación de múltiples fármacos de 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y oxaliplatino (también se conoce como protocolo FOLFIRINOX), o la combinación de nanopartículas de paclitaxel unidas a albúmina (nab) más gemcitabina. Esta última mostró un efecto superior a la monoterapia con gemcitabina (Von Hoff et al., 2013; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013). La FDA aprobó el erlotinib, un inhibidor de la quinasa, para la terapia combinada con gemcitabina para el paciente con cáncer de páncreas avanzado que no ha recibido quimioterapia. Sin embargo, la mediana de la supervivencia general con erlotinib y gemcitabina mejoró menos de 4 semanas (Moore et al., J. Clin. Oncol., 25(15):1960-6 (2007)).

40

45

50

55

60

[0005] El conducto biliar es una estructura en forma de tubo que transporta la bilis secretada desde el hígado hasta el duodeno. En el hígado, se vuelve más grueso al unirse con el conducto biliar como si cada rama de un árbol estuviera formada por las ramas de uno de ellos. Los conductos biliares izquierdo y derecho se combinan para formar un conducto biliar común. Los dos tipos de conductos biliares en el hígado son los conductos biliares intrahepáticos dentro del hígado y los conductos biliares extrahepáticos que transportan la bilis fuera del hígado, que conecta con el duodeno. La vesícula biliar ubicada en los conductos biliares extrahepáticos almacena y concentra temporalmente la

65

bilis del hígado, y el conducto biliar consta del conducto biliar y la vesícula biliar. Como un sistema de vasos que dirige las secreciones desde el hígado, el conducto biliar se conecta con el duodeno mientras se vuelve cada vez más y más grueso, como las ramas. La vesícula biliar es un lugar para la estasis primaria de la bilis. El cáncer de las vías biliares es un término general para el cáncer de las vías biliares y el cáncer de vesícula biliar, que surge de las células epiteliales del conducto biliar intrahepático. En el momento del diagnóstico, entre el 70 y el 80 por ciento de los pacientes con cáncer se encuentran en una etapa avanzada. Como solo entre el 30 y el 40 por ciento de ellos se tratan mediante cirugía y la tasa de supervivencia a cinco años para el cáncer es de alrededor del 7 por ciento, se trata de uno de los cánceres intratables. Aunque se han desarrollado diversos tipos de medicamentos contra el cáncer, hay muy pocos cánceres que se puedan curar solo con el medicamento. Esto se debe a que las células cancerosas no reaccionan con los medicamentos contra el cáncer, o el medicamento es eficaz para reducir el tamaño de las células tumorales en la etapa temprana del tratamiento, pero pierde su eficacia debido a problemas de resistencia al medicamento durante el tratamiento o después del mismo. Por lo tanto, para que el tratamiento sea eficaz contra los cánceres, el medicamento contra el cáncer debe superar los problemas de resistencia al medicamento, tales como la resistencia de las células cancerosas al medicamento contra el cáncer. En el caso del cáncer de las vías biliares, este problema se produce con frecuencia en el período temprano del tratamiento. Por lo tanto, la tasa de respuesta del medicamento contra el cáncer es de solo el 15 por ciento y la tasa de recurrencia después de la cirugía es del 85 por ciento. Esto demuestra claramente que no existe ningún medicamento contra el cáncer eficaz antes y después de la cirugía.

[0006] Los tumores malignos surgen de un órgano (tal como pulmón, hígado, riñón, estómago, colon, recto, etc.) y se propagan desde el lugar donde comenzó el cáncer a otra parte del cuerpo. La metástasis significa que los tumores malignos se propagan desde el lugar donde comenzó el cáncer a otra parte del cuerpo, lo que va acompañado de una progresión del tumor maligno. A medida que la célula tumoral maligna crece y el cáncer progresa, adquiere un nuevo carácter genético que es necesario para la metástasis, invade los vasos sanguíneos y las glándulas linfáticas, circula a través de ellos, se establece en otro órgano y crece.

[0007] Actualmente, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia se utilizan para la terapia del cáncer. Entre ellas, la quimioterapia es para tratar el cáncer con fármacos contra el cáncer. Recientemente, se utilizan alrededor de 60 tipos de fármacos contra el cáncer. Como se sabe mucho sobre el desarrollo del cáncer y las características de las células cancerosas, se han desarrollado activamente nuevos agentes contra el cáncer. Sin embargo, debido a que la terapia actual se ha centrado en la muerte o eliminación de las células cancerosas, existe una falta de investigación sobre medicamentos para prevenir el crecimiento y la metástasis del cáncer, que es la causa inmediata de un aumento en la tasa de supervivencia de los pacientes con cánceres. Por lo tanto, para mejorar la tasa de tratamiento del cáncer y la tasa de supervivencia de los pacientes, existe una gran necesidad de desarrollar un nuevo fármaco con una actividad contra el cáncer y efectos inhibidores tanto del crecimiento como la metástasis de las células cancerosas.

[Divulgación]

[Problema técnico]

[0008] Los inventores de la presente invención han confirmado que la clorfenesina, la cloroquina o la cloropirazina tienen efectos anticancerígenos y efectos inhibidores de la proliferación y metástasis de células cancerosas, y su combinación tiene un efecto sinérgico, completando así la presente invención.

[Solución técnica]

[0009] Para lograr los objetivos descritos anteriormente, la presente invención da a conocer la composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer, que incluye la composición clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como principio activo.

[0010] Además, la presente invención da a conocer la composición farmacéutica para inhibir la proliferación y la metástasis del cáncer, que incluye la composición clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como principio activo.

[0011] Además, la presente invención da a conocer el adyuvante contra el cáncer que incluye clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina,

[Efectos beneficiosos]

[0012] La presente invención se refiere a una composición contra el cáncer para inhibir la proliferación y metástasis de células cancerosas, en la que el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares, y es posible inhibir eficazmente la proliferación y metástasis administrando clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina.

[Descripción de los dibujos]

[0013]

La Figura 1 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 por clorfenesina (OC-201).

La Figura 2 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 por cloroquina (OC-202).

La Figura 3 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 por cloropirazina (OC-203).

La Figura 4 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 mediante el tratamiento con clorfenesina y cloroquina en combinación.

La Figura 5 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 mediante el tratamiento con clorfenesina y cloropirazina en combinación.

La Figura 6 es una vista que muestra el grado de migración de las células SW480 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el grado de migración de las células SW480 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 8 es una vista que muestra el grado de migración de las células HCT116 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el grado de migración de las células HCT116 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 10 es una vista que muestra el grado de migración de las células CT26 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 11 es un gráfico que muestra el grado de migración de las células CT26 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 12 es una vista que muestra el grado de migración de células SW480 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 13 es una gráfica que muestra el grado de migración de células SW480 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 14 es una vista que muestra el grado de migración de células HCT116 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 15 es una gráfica que muestra el grado de migración de células HCT116 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 16 es una vista que muestra el grado de migración de células CT26 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 17 es una gráfica que muestra el grado de migración de células CT26 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o en combinación.

La Figura 18 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células SW480 según la concentración del tratamiento con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 19 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células HCT116 según la concentración del tratamiento con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 20 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células CT26 según la concentración del tratamiento con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 21 es una vista para confirmar el efecto sobre la inhibición de la migración de células HCT116 mediante el tratamiento con clorfenesina sola a través de un ensayo de cicatrización de heridas.

La Figura 22 es una vista para confirmar el efecto sobre la inhibición de la migración de células HCT116 mediante el tratamiento con clorfenesina sola a través de un ensayo de cicatrización de heridas.

La Figura 23 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de cicatrización de heridas de HCT116 mediante tratamiento con clorfenesina sola.

La Figura 24 es una vista para confirmar el efecto sobre la inhibición de la migración de células HCT116 mediante el tratamiento con cada una de cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) solas a través de un ensayo de cicatrización de heridas.

La Figura 25 es una vista para confirmar el efecto sobre la inhibición de la migración de células HCT116 mediante el tratamiento con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación a través de un ensayo de cicatrización de heridas.

La Figura 26 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de cicatrización de heridas de células HCT116 mediante el tratamiento con cloroquina o cloropirazina sola o con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 27 es una vista que muestra los resultados del análisis de la formación de colonias de células HCT116 según la concentración del tratamiento con clorfenesina.

La Figura 28 es una vista que muestra los resultados del análisis de la formación de colonias de células HCT116 según la concentración de tratamiento único de clorfenesina, cloroquina o cloropirazina o la concentración de tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina.

La Figura 29 es una vista que muestra los resultados del análisis de la formación de colonias de células CT26 según la concentración de tratamiento único de clorfenesina, cloroquina o cloropirazina o la concentración de tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina.

La Figura 30 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento con clorfenesina.

La Figura 31 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento con cloroquina.

La Figura 32 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento con cloropirazina.

5 La Figura 33 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento de combinación de 5  $\mu$ M de clorfenesina y de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de cloroquina.

10 La Figura 34 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento de combinación de 0,5  $\mu$ M de cloroquina y de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina.

La Figura 35 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento de combinación de 1  $\mu$ M de cloroquina y 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina.

15 La Figura 36 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento de combinación de 5  $\mu$ M de cloroquina y 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina.

La Figura 37 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 según la concentración del tratamiento de combinación de 5  $\mu$ M de clorfenesina y 1  $\mu$ M a 25  $\mu$ M de cloropirazina.

20 La Figura 38 es una vista que muestra el grado de migración de la línea celular de cáncer de páncreas Panc-1 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina sola o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 39 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de páncreas Panc-1 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

25 La Figura 40 es una vista que muestra el grado de migración de la línea celular de cáncer de páncreas Aspc-1 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

30 La Figura 41 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de páncreas Aspc-1 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 42 es una vista que muestra los resultados del ensayo de invasión de la línea celular de cáncer de páncreas Panc-1 tratada con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

35 La Figura 43 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la invasión de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de páncreas Panc-1 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 44 es una vista que muestra los resultados del ensayo de invasión de la línea celular de cáncer de páncreas MIACaPa2 según el tratamiento con clorfenesina, cloroquina o cloropirazina solas o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

40 La Figura 45 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la invasión de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de páncreas MIACaPa2 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

45 La Figura 46 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 47 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 según la concentración de cloroquina.

La Figura 48 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 según la concentración de cloropirazina.

50 La Figura 49 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 según la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina.

La Figura 50 es un gráfico que muestra las tasas de supervivencia celular de las células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 según la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloropirazina.

55 La Figura 51 es una vista que muestra el grado de inhibición de la migración de la célula de cáncer de las vías biliares SNU1079 según la concentración de clorfenesina.

La Figura 52 es un gráfico que muestra el grado de inhibición de la migración de la célula de cáncer de las vías biliares SNU1079 según la concentración de clorfenesina.

60 La Figura 53 es una vista que muestra el grado de inhibición de la migración de células de cáncer de las vías biliares SNU1079 tratadas con clorfenesina, cloroquina y cloropirazina solas o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 54 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la migración de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

65 La Figura 55 es una vista que muestra un efecto sobre la inhibición de la invasión de la célula de cáncer de las vías biliares SNU1079 tratada con clorfenesina, cloroquina y cloropirazina solas o clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 56 es una vista que muestra un efecto sinérgico sobre la inhibición de la invasión de células según la concentración del tratamiento de combinación en la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 tratada con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación.

La Figura 57 es un gráfico que muestra el resultado de la evaluación de la citotoxicidad de la clorfenesina.

La Figura 58 es una imagen de tinción de células CT26 y células HCR116 tratadas con clorfenesina o sin tratar.

La Figura 59 es una imagen de tinción de una capa seccional de células CT26 tratadas con clorfenesina o sin tratar.

La Figura 60 es un gráfico que muestra la imagen de los pulmones y el número de nódulos que aparecen en los pulmones recogidos en el modelo animal de cáncer metastásico.

La Figura 61 es un gráfico que muestra los resultados de la medición del peso corporal y el tamaño del tumor en el modelo animal de metástasis del cáncer.

[Modos de la invención]

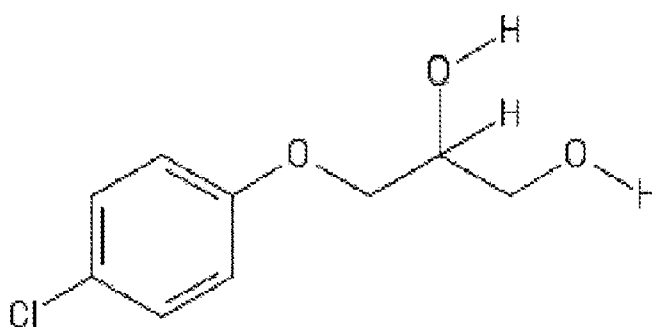
[0014] A continuación, se describe en detalle la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención. Cuando se determine que la descripción específica de técnicas o configuraciones conocidas por los expertos en la materia oscurece innecesariamente la materia de la presente invención, se podrá excluir la descripción y la presente invención no se limitará a ella. La presente invención permite diversas modificaciones y aplicaciones dentro de la descripción de las reivindicaciones adjuntas.

[0015] Además, las terminologías utilizadas en el presente documento son términos utilizados para representar adecuadamente realizaciones preferidas de la presente invención. Pueden variar dependiendo de la intención de los usuarios u operadores, o de la costumbre en la técnica a la que pertenece la presente invención. En consecuencia, las definiciones de estos términos deben basarse en el contenido de toda esta memoria descriptiva. En la memoria descriptiva, cuando se hace referencia a una parte como "que comprende" un componente, significa que puede incluir además otros componentes sin excluir otros componentes a menos que se describa específicamente lo contrario.

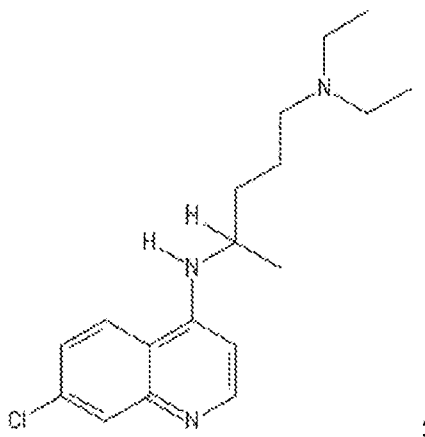
[0016] En un aspecto, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer colorrectal, el cáncer de páncreas o el cáncer de las vías biliares, en la que la composición incluye clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como principio activo.

[0017] La clorfenesina está representada por la siguiente fórmula química 1, la cloroquina está representada por la siguiente fórmula química 2 y la cloropirazina está representada por la siguiente fórmula química 3:

[Fórmula Química 1]

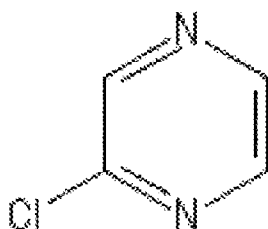


[Fórmula Química 2]



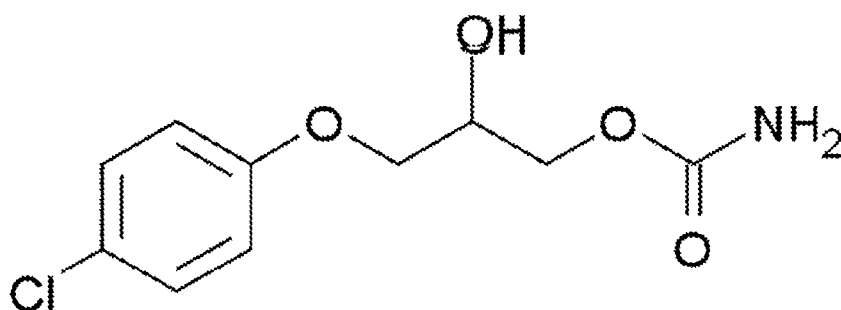
5 y

[Fórmula Química 3]



10 [0018] En una realización, la clorfenesina puede ser carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4:

[Fórmula Química 4]



15 [0019] El carbamato de clorfenesina de la presente invención se utiliza principalmente como relajante muscular y se sabe que tiene efectos de sedación y alivio de la ansiedad y efectos antifúngicos y antibacterianos.

[0020] El documento WO 2012/128689 divulga una composición que comprende cloroquina y su uso en el tratamiento del cáncer. HANNELORE MAES ET AL: "Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy",

CANCER CELL, vol. 26, núm. 2, 1 de agosto de 2014 (2014-08-01), páginas 190-206, también divulga el uso de cloroquina para tratar el cáncer.

[0021] El documento WO 2011/109469 divulga una composición que comprende clorfenesina para tratar el cáncer de piel.

[0022] El documento WO 2017/011816 divulga el uso de clorfenesina para reducir los efectos secundarios de la terapia con oxaliplatino.

[0023] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir clorfenesina y cloroquina, clorfenesina y cloropirazina, o clorfenesina, cloroquina y clorfenesina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como principio activo. La clorfenesina y la cloroquina o la clorfenesina y la cloropirazina se incluyen más preferiblemente porque tienen un efecto contra el cáncer sinérgico.

[0024] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir de 5 a 500  $\mu\text{M}$  de clorfenesina, de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina o de 1 a 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina cuando se incluyen clorfenesina y cloroquina en combinación. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 25 a 50  $\mu\text{M}$  de cloropirazina cuando se incluyen clorfenesina y cloropirazina en combinación. En un ejemplo de la presente invención, la clorfenesina, la cloroquina y/o la cloropirazina de la presente invención inhiben la migración e invasión de células cancerosas sin citotoxicidad significativa en el intervalo de concentración descrito anteriormente en experimentos celulares.

[0025] El cáncer que se va a tratar es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares. Una realización de la presente invención confirmó el efecto contra el cáncer de la clorfenesina, la cloroquina y la clorfenesina solas, y el efecto contra el cáncer mediante un tratamiento de combinación de acuerdo con la combinación para la línea celular de carcinoma de colon derivada de ratón CT26, la línea celular de carcinoma colorrectal derivada de humano HCT116, la línea celular de carcinoma de colon derivada de humano SW480, la línea celular de carcinoma pancreático derivada de humano Panc-1, la línea celular de cáncer pancreático derivada de humano Aspc-1, la línea celular de cáncer pancreático derivada de humano MIAPaCA2, la línea celular de carcinoma de vesícula biliar derivada de humano SNU308 y la línea celular de colangiocarcinoma intrahepático derivada de humano SNU1079.

[0026] La presente invención incluye clorfenesina, cloroquina y cloropirazina representadas por las Fórmulas Químicas 1 a 3, así como todas sus sales farmacéuticamente aceptables y posibles solvatos, hidratos, racematos o estereoisómeros de las mismas.

[0027] La clorfenesina, cloroquina y cloropirazina representadas por las Fórmulas Químicas 1 a 3 de la presente invención se pueden utilizar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y las sales de adición de ácido formadas por un ácido libre farmacéuticamente aceptable son útiles como una sal. La sal de adición de ácido se obtiene a partir de un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido azílico o ácido fosforoso, o un ácido orgánico no tóxico, tal como mono- o dicarboxilato alifático, alcanato sustituido con fenilo, hidroxialcanato y alcanodioato, un ácido aromático, ácido sulfónico alifático y aromático. Dicha sal farmacéuticamente no tóxica incluye sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrógenofosfato, dihidrógenofosfato, metafosfato, cloruro de pirofosfato, bromuro, yoduro, fluoruro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caprato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexano-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, tereftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, clorobencenosulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, hidroxibutirato, glicolato, maleato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato o mandelato.

[0028] La sal de adición de ácido según la presente invención se puede preparar mediante el procedimiento convencional, por ejemplo, disolviendo clorfenesina, cloroquina y cloropirazina representadas por las Fórmulas Químicas 1 a 3 en una cantidad excesiva de una solución ácida acuosa y a continuación precipitar las sales resultantes utilizando un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo, metanol, etanol, acetona o acetonitrilo. Además, la sal de adición de ácido se puede preparar evaporando un disolvente o un exceso de ácido en la mezcla seguido de la realización de una filtración en seco o por succión de la sal precipitada.

[0029] Además, la sal metálica farmacéuticamente aceptable se puede preparar utilizando una base. Una sal de metal alcalino o de metal alcalinotérreo se obtiene, por ejemplo, disolviendo un compuesto en una cantidad en exceso de una solución de hidróxido de metal alcalino o de hidróxido de metal alcalinotérreo, filtrando una sal de compuesto no disuelta y evaporando y secando el filtrado. En este caso, la sal metálica considerada adecuada para uso farmacéutico es una sal de sodio, una sal de potasio o una sal de calcio. Además, una sal de plata correspondiente a la misma se obtiene haciendo reaccionar una sal de un metal alcalino o de un metal alcalinotérreo con una sal de plata adecuada (por ejemplo, nitrato de plata).



[0030] La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además fármacos contra el cáncer conocidos además de clorfenesina, cloroquina y cloropirazina como principios activos, y puede utilizarse en combinación con otros tratamientos conocidos para el tratamiento de estas enfermedades. Otros tratamientos incluyen, pero sin limitarse a los mismos, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, trasplante de médula ósea, terapia de reemplazo de células madre, otras terapias biológicas, inmunoterapia y similares.

[0031] El término "prevención" utilizado en el presente documento se refiere a todo tipo de acciones que inhiben o retrasan el desarrollo, la propagación y la recurrencia del cáncer mediante la administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, y el término "tratamiento" utilizado en el presente documento se refiere a todo tipo de acciones que mejoran o alteran la muerte de las células cancerosas o los síntomas del cáncer mediante la administración de la composición que incluye al menos una seleccionada del grupo que consiste en clorfenesina, cloroquina y cloropirazina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la materia pueden entender los criterios exactos de la enfermedad sobre la que las composiciones de este documento tienen efectos y determinar el grado de mejora, mejoría y tratamiento con referencia a los datos presentados por la Academia Coreana de Ciencias Médicas, etc.

[0032] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" utilizado en combinación con el principio activo en la presente invención se refiere a una cantidad eficaz para prevenir o tratar una enfermedad del sujeto, y la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención puede determinarse por diversos factores, por ejemplo, procedimiento de administración, sitio diana, la condición del paciente y similares. Por lo tanto, la dosis cuando se utiliza en el cuerpo humano debe determinarse en cantidades apropiadas teniendo en cuenta la seguridad y la eficacia. También es posible estimar la cantidad utilizada en humanos a partir de la cantidad eficaz determinada por experimentos con animales. Estos asuntos que se deben considerar para determinar la cantidad eficaz se describen, por ejemplo, en Hardman y Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.<sup>a</sup> ed. (2001), Pergamon Press; y E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed. (1990), Mack Publishing Co.

[0033] La composición de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" utilizado en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para tratar la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable para el tratamiento médico y una cantidad que no cause efectos secundarios. El nivel de una dosificación eficaz puede determinarse mediante parámetros que incluyen un estado de salud del paciente, el tipo de cáncer, la gravedad, la actividad de un fármaco, la sensibilidad a un fármaco, un procedimiento de administración, el tiempo de administración, una vía de administración y una velocidad de liberación, la duración del tratamiento, fármacos formulados o coutilizados y otros parámetros bien conocidos en los campos médicos. La composición de la presente invención puede administrarse como un agente terapéutico individual o en combinación con otros agentes terapéuticos. Puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con un agente terapéutico convencional o administrarse en un régimen de dosis única o múltiple. Teniendo en cuenta todos los factores anteriores, es importante administrar una dosis tal que se obtenga un efecto máximo con una cantidad mínima sin un efecto secundario y la dosis puede ser determinada fácilmente por aquellos con conocimientos ordinarios en la materia.

[0034] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir portadores, diluyentes, excipientes o una combinación de dos o más de los mismos utilizados habitualmente en formulaciones biológicas. El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, significa que la composición está libre de toxicidad para las células o los seres humanos expuestos a la composición. El portador no está particularmente limitado siempre que sea adecuado para la administración de la composición al cuerpo vivo. Por ejemplo, pueden mezclarse y usarse compuestos, soluciones salinas, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol descritos en el Índice Merck, 13.<sup>a</sup> ed., Merck & Co. Inc. y uno o más de sus ingredientes. Si es necesario, pueden agregarse aditivos convencionales, tales como antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. La composición también puede prepararse en forma de dosificación para inyección, tal como solución acuosa, suspensión o emulsión, comprimido, cápsula, polvo o píldora mediante la inclusión adicional de diluyentes, dispersantes, surfactantes, aglutinantes y lubricantes. Además, la composición puede formularse en una forma deseada dependiendo de la enfermedad a la que se dirija o de sus ingredientes, utilizando el procedimiento descrito en Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton Pa., 18 de marzo de 1990)).

[0035] En una realización, la composición farmacéutica puede ser una o más formulaciones seleccionadas del grupo que consiste en formulaciones orales, preparaciones externas, supositorios, soluciones inyectables estériles y aerosoles, y más preferiblemente formaciones orales o formulaciones inyectables.

[0036] El término "administración", tal como se utiliza en el presente documento, significa proporcionar una sustancia predeterminada a un individuo o un paciente mediante cualquier procedimiento apropiado y puede administrarse por vía oral o parenteral (por ejemplo, mediante la aplicación en formulaciones inyectables por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o tópica). La dosis puede variar dependiendo del peso corporal del paciente, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, el tiempo de administración, el procedimiento de administración, la tasa de excreción, la gravedad de la enfermedad y similares. Las formulaciones líquidas para administración oral de la composición de

la presente invención incluyen suspensiones, líquidos orales, emulsiones, jarabes y similares. Además de agua y parafina líquida que son diluyentes simples habitualmente utilizados, pueden incluirse varios excipientes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes, conservantes y similares. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas, supositorios y similares. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse mediante cualquier dispositivo capaz de mover la sustancia activa a las células diana. El procedimiento de administración y las formulaciones preferidas incluyen inyecciones intravenosas, subcutáneas, intradérmicas, intramusculares, por goteo y similares. La solución inyectable puede prepararse utilizando un disolvente acuoso, tal como una solución salina fisiológica y solución de Ringer y un disolvente no acuoso, tal como un aceite vegetal, un éster de ácido graso superior (por ejemplo, oleato de etilo), un alcohol (por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, propilenglicol, glicerina, etc.) y puede incluir portadores farmacéuticos, tales como estabilizadores, para evitar el deterioro (por ejemplo, ácido ascórbico, hidrogenosulfito de sodio, pirofosfato de sodio, BHA, tocoferol, EDTA, etc.), un emulsionante, un tampón para el control del pH, conservantes para la inhibición del crecimiento microbiano (por ejemplo, nitrato fenilmercúrico, timerosal, cloruro de benzalconio, fenol, cresol, alcohol bencílico, etc.).

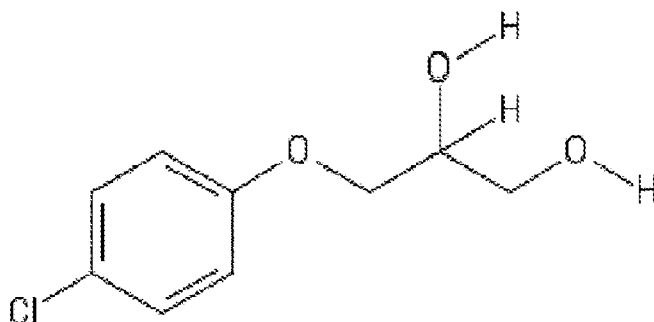
[0037] El término "individuo" tal como se utiliza en el presente documento significa todos los animales que han desarrollado el cáncer o que son capaces de desarrollar el cáncer, incluidos seres humanos, un mono, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, un pollo, un pavo, una codorniz, un gato, un perro, un ratón, una rata, un conejo o una cobaya. Estas enfermedades se pueden prevenir o tratar de forma eficaz administrando la composición farmacéutica de la presente invención a un individuo. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en combinación con agentes terapéuticos convencionales.

[0038] La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un aditivo farmacéuticamente aceptable, que se ejemplifica con almidón, almidón gelatinizado, celulosa microcristalina, azúcar de leche, povidona, dióxido de silicio coloidal, hidrogenofosfato de calcio, lactosa, manitol, caramelo masticable, goma de Arabia, almidón pregelatinizado, almidón de maíz, polvo de celulosa, hidroxipropilcelulosa, Opadry, glicolato de almidón sódico, cera de carnauba, silicato de aluminio sintético, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, azúcar blanco, dextrosa, sorbitol, talco, etc. El aditivo farmacéuticamente aceptable de la presente invención se añade preferiblemente a la composición en una cantidad de 0,1 a 90 partes en peso, pero no se limita a la misma.

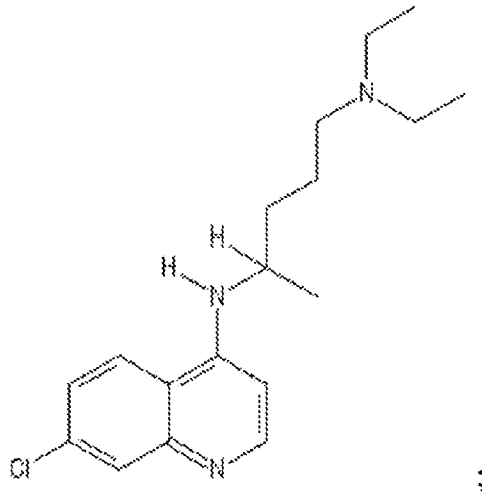
[0039] En un aspecto, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica para inhibir la proliferación y metástasis del cáncer, en la que la composición incluye clorfenesina o carbamato de clorfenesina y opcionalmente cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como principio activo.

[0040] La clorfenesina está representada por la siguiente fórmula química 1, la cloroquina está representada por la siguiente fórmula química 2 y la cloropirazina está representada por la siguiente fórmula química 3:

[Fórmula Química 1]

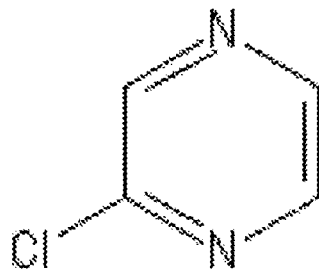


[Fórmula Química 2]



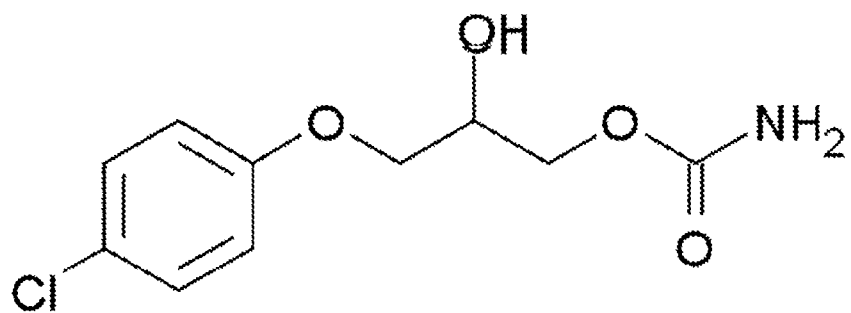
5 y

[Fórmula Química 3]



10 [0041] En una realización, la clorfenesina puede ser carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4:

[Fórmula Química 4]



[0042] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir clorfenesina y cloroquina, clorfenesina y cloropirazina, o clorfenesina, cloroquina y clorfenesina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como principio activo. La composición farmacéutica incluye preferiblemente clorfenesina y cloroquina, o clorfenesina y cloropirazina porque tienen un efecto de inhibición sinérgica de la metástasis y la invasión.

[0043] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir de 5 a 500  $\mu\text{M}$  de clorfenesina, de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina o de 1 a 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina cuando se incluyen clorfenesina y cloroquina en combinación. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 25 a 50  $\mu\text{M}$  de cloropirazina cuando se incluyen clorfenesina y cloropirazina en combinación. En un ejemplo de la presente invención, inhibe la migración e invasión de células cancerosas sin citotoxicidad significativa en el intervalo de concentración descrito anteriormente.

[0044] La clorfenesina de la presente invención puede inhibir únicamente la proliferación y la metástasis de células cancerosas, no la muerte de células cancerosas, a una concentración baja de 0,1  $\mu\text{M}$  a 10 mM. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir clorfenesina que tenga una concentración baja que varía de 1  $\mu\text{M}$  a 1 mM. En el caso de la clorfenesina a una concentración inferior a 1  $\mu\text{M}$ , el efecto inhibitorio de la proliferación y la metástasis del cáncer se reduce en comparación con 1  $\mu\text{M}$ , y puede exhibir citotoxicidad a concentraciones superiores a 1 mM, en particular, 10 mM o más.

[0045] El cáncer puede ser cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares. Una realización de la presente invención confirmó el efecto inhibitorio de la metástasis y la invasión de células cancerosas de clorfenesina, cloroquina y cloropirazina solas, y el efecto inhibitorio de la metástasis y la invasión de células cancerosas mediante un tratamiento de combinación de acuerdo con la combinación de las mismas para la línea celular de carcinoma de colon derivada de ratón CT26, la línea celular de carcinoma colorrectal derivada de humano HCT116, la línea celular de carcinoma de colon derivada de humano SW480, la línea celular de carcinoma pancreático derivada de humano Panc-1, la línea celular de cáncer pancreático derivada de humano Aspc-1, la línea celular de cáncer pancreático derivada de humano MIAPaCA2, la línea celular de carcinoma de vesícula biliar derivada de humano SNU308 y la línea celular de colangiocarcinoma intrahepático derivada de humano SNU1079.

[0046] En un aspecto, la presente invención se refiere al adyuvante contra el cáncer que incluye clorfenesina o carbamato de clorfenesina en combinación con cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como principio activo.

[0047] En una realización, la clorfenesina de la presente invención puede inhibir únicamente la proliferación y la metástasis de células cancerosas, no la muerte de células cancerosas, a una concentración baja de modo que se puede minimizar la citotoxicidad cuando se administra conjuntamente con un fármaco contra el cáncer que tiene citotoxicidad. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir clorfenesina que tiene una concentración baja que varía de 1  $\mu\text{M}$  a 1 mM. En el caso de la clorfenesina a una concentración de menos de 1  $\mu\text{M}$ , no existe el efecto inhibitorio de la proliferación y la metástasis del cáncer, y la citotoxicidad se puede exhibir a concentraciones superiores a 1 mM, particularmente, 10 mM o más.

[0048] En una realización, se pueden incluir clorfenesina y cloroquina, o clorfenesina y cloropirazina como principios activos. En una realización de la presente invención, se confirma que el tamaño del tumor y la metástasis inducida por la línea celular de carcinoma de colon derivada de ratón CT26 se inhiben significativamente mediante el tratamiento de combinación de clorfenesina y un agente contra el cáncer.

[0049] Entre los ejemplos de agentes contra el cáncer que pueden incluirse en la composición farmacéutica de la presente invención se incluyen agentes alquilantes de ADN, tales como mecloetamina, clorambucilo, fenilalanina, mostaza, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), estreptozotocina, busulfán, tiotepa, cisplatino y carboplatino; antibióticos contra el cáncer, tales como dactinomicina (actinomicina D), doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona, plicamicina, mitomicina C y bleomicina; y alcaloides vegetales, tales como vincristina, vinblastina, paclitaxel, docetaxel, etopósido, tenipósido, topotecán e iridotecán, pero no se limitan a los mismos.

[0050] El término "alimento funcional para la salud", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un alimento preparado y procesado en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, líquidos y píldoras utilizando materias primas y componentes que tienen funciones útiles en el cuerpo humano. En este documento, "funcional" significa obtener efectos beneficiosos para la salud, tales como controlar los nutrientes o la acción fisiológica para la estructura y función del cuerpo humano.

[0051] En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer colorrectal, el cáncer de páncreas o el cáncer de las vías biliares, en el que el procedimiento incluye administrar clorfenesina o carbamato de clorfenesina, opcionalmente en combinación con cloroquina o cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

[0052] En una realización, se pueden administrar clorfenesina y cloroquina, clorfenesina y cloropirazina, o clorfenesina, cloroquina y cloropirazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. La clorfenesina y la cloroquina, o la clorfenesina y la cloropirazina, se pueden administrar en combinación porque tienen un efecto sinérgico contra el cáncer.

[0053] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir de 5 a 500  $\mu\text{M}$  de clorfenesina, de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina o de 1 a 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina cuando se incluyen clorfenesina y cloroquina en combinación. La composición farmacéutica puede incluir 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina (concentración fija) y de 25 a 50  $\mu\text{M}$  de cloropirazina cuando se incluyen clorfenesina y cloropirazina en combinación. En un ejemplo de la presente invención, inhibe la migración e invasión de células cancerosas sin citotoxicidad significativa en el intervalo de concentración descrito anteriormente.

[0054] El cáncer a tratar es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares.

[0055] En un aspecto, la presente invención se refiere a un uso de clorfenesina o carbamato de clorfenesina opcionalmente en combinación con cloroquina o cloropirazina, sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, para preparar una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer.

[0056] La presente invención se describe con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, los siguientes Ejemplos tienen únicamente el propósito de ilustrar la presente invención, y por lo tanto la presente invención no se limita a los mismos.

#### **Ejemplo 1. Confirmación del efecto contra el cáncer y del efecto inhibidor de la metástasis en el cáncer colorrectal**

##### **1-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular**

##### **1-1-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante una sola administración**

[0057] Para confirmar el efecto de la clorfenesina (denominada OC-201), la cloroquina (denominada OC-202) y la cloropirazina (denominada OC-203) solas sobre la tasa de supervivencia de las células de cáncer colorrectal, se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer colorrectal se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con 0  $\mu\text{M}$  (control: tratamiento con DMSO), 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se extrajo el medio y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30 °C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la siguiente ecuación 1.

[Ecuación 1]

Tasa de supervivencia celular = absorbancia del grupo experimental (a 570 nm) / absorbancia del control (a 570 nm)  $\times 100$  (%)

[0058] Como resultado, se confirmó que cuando OC-201 era superior a 500  $\mu\text{M}$  y OC-202 era superior a 10  $\mu\text{M}$ , mostraban toxicidad, y OC-203 no debía ser tóxico a 100  $\mu\text{M}$  o menos tal como se muestra en las figuras 1 a 3.

##### **1-1-2. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante la administración de combinación**

[0059] Para confirmar la tasa de supervivencia celular de las células de cáncer colorrectal mediante el tratamiento de combinación de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203), se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer colorrectal se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 500 nM, 5  $\mu\text{M}$  + 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  + 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se extrajo el medio y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30 °C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la ecuación 1 anterior.

[0060] Como resultado, cuando se utilizó clorfenesina 5  $\mu\text{M}$  en combinación con cloroquina a 25  $\mu\text{M}$  o más, fue tóxica para el cáncer colorrectal (Figura 4). Cuando se utilizó clorfenesina a 5  $\mu\text{M}$  en combinación con cloropirazina a 100  $\mu\text{M}$  o menos, no fue tóxica para el cáncer colorrectal (Figura 5).

## 5 1-2. Confirmación de la migración celular

### 1-2-1. Ensayo de migración

#### 1-2-1-1. Administración única de clorfenesina

[0061] La metástasis de células cancerosas debe basarse en la motilidad celular. Por lo tanto, la movilidad de las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480, HCT116 y CT26 de acuerdo con la concentración de tratamiento de clorfenesina (OC-201) se confirmó mediante el ensayo de migración. Específicamente, las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 se suspendieron en RPMI sin suero y se agregaron a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en la cámara superior de una cámara Transwell de 24 pocillos con una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 8,0  $\mu\text{m}$ , Costar). Se colocó laminina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en el pocillo inferior y cada célula se trató con clorfenesina (OC-201) a 0  $\mu\text{M}$  (tratamiento de control con DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM y 2 mM, respectivamente. Las células se cultivaron durante 18 horas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  a 37 °C y se dejó que migraran. A continuación, las células se fijaron con alcohol metílico al 70 % en PBS durante 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células se tiñeron con hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada. Las células no migradas se eliminaron de la superficie superior de la membrana con un hisopo de algodón. Las membranas se extrajeron de la cámara y se fijaron con Gel Mount (Biomed, Foster City, CA, EE. UU.). Las células migradas (células adheridas a la superficie inferior de la membrana) se contaron en un endoscopio seleccionado al azar en un campo de alta potencia (x20).

[0062] Como resultado, cuando la línea celular SW480 se trató con clorfenesina (OC-201) a 25  $\mu\text{M}$  o más, su migración celular se redujo significativamente (Figuras 6 y 7). Además, en la línea celular HCT116, la migración celular disminuyó cuando se trató con clorfenesina (OC-201), especialmente cuando se trató a 250  $\mu\text{M}$  o más (Figuras 8 y 9). Además, en la línea celular CT26, la migración celular disminuyó cuando se trató con clorfenesina (OC-201), especialmente cuando se trató a 250  $\mu\text{M}$  o más (Figuras 10 y 11).

#### 1-2-1-2. Administración de combinación

[0063] Se observó el grado de migración de las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 cuando se trataron con clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) solas y se trataron con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación. Específicamente, las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 o SW480 se trataron con un control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), cloroquina (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), y clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ), y a continuación se confirmó el grado de migración celular de la misma manera que en los Ejemplos anteriores. Además, se calculó el efecto sinérgico del tratamiento de combinación mediante el índice de combinación (IC) según la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina utilizando el software Compusyn.

[0064] Como resultado, la migración de todas las líneas celulares de cáncer colorrectal CT26, HCT116 y SW480 disminuyó cuando se trataron con clorfenesina y cloroquina o clorfenesina y cloropirazina en combinación que cuando se trataron con cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) solas, respectivamente (Figuras 12 a 17). Además, se demostró una acción sinérgica cuando se combinó clorfenesina con cloroquina o cloropirazina. En particular, cuando se utilizaron clorfenesina y cloroquina en combinación, la acción sinérgica se exhibió en todas las líneas celulares (Figuras 18 a 20).

### 1-2-2. Ensayo de cicatrización de heridas

#### 1-2-2-1. Administración única de clorfenesina

[0065] La metástasis de células cancerosas debe basarse en la motilidad celular. Por lo tanto, el grado de migración de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 según el tratamiento con clorfenesina (OC-201) sola se confirmó mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Específicamente, la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 se añadió a RPMI suplementado con 10 % FBS. Después de 24 horas, las células se inocularon en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a la concentración en la que se alcanzó una confluencia del 70 % al 80 % mediante una monocapa. Se aplicó un raspado cuidadoso y lento a la monocapa con una nueva punta de pipeta amarilla de 200  $\mu\text{l}$  a través del centro del pocillo. La distancia de separación resultante fue igual al diámetro exterior de las puntas. Después del raspado, la placa se lavó cuidadosamente dos veces con medio para extraer las células separadas. Posteriormente, las células fueron tratadas con clorfenesina a 0  $\mu\text{M}$  (DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  o 1 mM, respectivamente. Después de incubarlas durante 0 horas, 8 horas y 24 horas, las células fueron observadas con un microscopio y los resultados se representaron en gráficas.

[0066] Como resultado, cuando se trató con clorfenesina a 25  $\mu\text{M}$  o más, la migración de células de cáncer colorrectal disminuyó (Figuras 21 a 23).

#### 1-2-2. Administración de combinación

[0067] Se confirmó el grado de migración de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 según el tratamiento único con cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) y el tratamiento de combinación con clorfenesina (OC-201) y cloroquina (OC-202) o cloropirazina (OC-203). Específicamente, la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 se añadió a RPMI suplementado con 10 % FBS. Después de 24 horas, las células se inocularon en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a la concentración en la que se alcanzó una confluencia del 70 % al 80 % mediante una monocapa. Se aplicó un raspado cuidadoso y lento a la monocapa con una nueva punta de pipeta amarilla de 200  $\mu\text{l}$  a través del centro del pocillo. La distancia de separación resultante fue igual al diámetro exterior de las puntas. Después del raspado, la placa se lavó cuidadosamente dos veces con medio para extraer las células separadas. Posteriormente, las células se trataron con cloroquina sola (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina sola (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina en combinación (5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), y clorfenesina y cloropirazina en combinación (5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ). Después de incubarlo durante 0 horas, 8 horas y 24 horas, se confirmó el grado de migración celular de la misma manera que en el Ejemplo 1-2-2-1.

[0068] Como resultado, la migración de células de cáncer colorrectal disminuyó cuando se trató con clorfenesina y cloroquina (OC-202) o cloropirazina (OC-203) en comparación con cuando se trató con cloroquina (OC-202) o cloropirazina (OC-203) sola, respectivamente (Figuras 24 a 26).

#### 1-3. Ensayo de crecimiento independiente del anclaje

##### 1-3-1. Administración única de clorfenesina

[0069] El crecimiento independiente del anclaje es una propiedad crítica que distingue a las células normales de las células cancerosas. Requiere anclaje cuando proliferan las células normales, pero las células cancerosas pueden sobrevivir y multiplicarse sin anclaje. En otras palabras, las células normales pueden no proliferar a menos que se adhieran a la placa de cultivo, pero las células cancerosas pueden proliferar en un estado flotante sin anclaje celular como un agar blando. Estas propiedades se utilizan para confirmar su crecimiento independiente del anclaje a través del ensayo de formación de colonias en agar blando. En primer lugar, se realizó un ensayo de formación de colonias para confirmar el crecimiento independiente del anclaje de las líneas celulares de cáncer colorrectal a través de la administración única de clorfenesina. Específicamente, se mezclaron 3.000 líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116 con un agar blando y la mezcla se dividió en placas de 6 pocillos y a continuación se trató con clorfenesina a 0  $\mu\text{M}$  (DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM o 2 mM, respectivamente. Posteriormente, se suplementó con clorfenesina cada vez que se reemplazó el medio de cultivo celular. Después de 3 semanas, se observaron las células.

[0070] Como resultado, tal como se muestra en la Figura 27, cuando se utilizó clorfenesina a 250  $\mu\text{M}$  o más, la capacidad de formación de colonias disminuyó.

##### 1-3-2. Administración de combinación

[0071] Para confirmar si la administración de combinación de clorfenesina y cloroquina (OC-202) o cloropirazina (OC-203) inhibe el crecimiento independiente del anclaje de líneas celulares de cáncer colorrectal en comparación con la administración única tal como se describió anteriormente, las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116 y CT26 se trataron con clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), cloroquina (10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina (10  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ), y se realizó el ensayo de formación de colonias.

[0072] Como resultado, la formación de colonias disminuyó cuando se utilizaron clorfenesina y cloroquina en combinación que cuando se trataron con cloroquina o cloropirazina solas, respectivamente (Figuras 28 y 29).

### **Ejemplo 2. Confirmación del efecto sobre el cáncer de páncreas**

#### 2-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular

##### 2-1-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante una sola administración

[0073] Para confirmar el efecto de la administración única de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203), respectivamente, sobre la tasa de supervivencia de las células de cáncer de páncreas, se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer de páncreas se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con 0  $\mu\text{M}$  (control: tratamiento con DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM (1000  $\mu\text{M}$ )

de clorfenesina (OC-201), 0  $\mu$ M (control: tratamiento con DMSO), 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de cloroquina (OC-202) y 0  $\mu$ M (control: tratamiento con DMSO), 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de cloropirazina (OC-203) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu$ L de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30°C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la ecuación 1, tal como se describió anteriormente.

[0074] Como resultado, tal como se muestra en las Figuras 30 a 32, el grupo de administración única de clorfenesina y cloropirazina no mostró citotoxicidad incluso en dosis altas, pero la cloroquina mostró citotoxicidad en concentraciones de 50  $\mu$ M o más.

#### 2-1-2. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante la administración de combinación

[0075] Para confirmar la tasa de supervivencia de células de cáncer de páncreas mediante el tratamiento de combinación de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203), se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas celulares de cáncer de páncreas Aspc-1, MIAPaCA2 y Panc-1 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer de páncreas se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (5  $\mu$ M), clorfenesina y cloroquina (tratamiento de combinación con 5  $\mu$ M de clorfenesina y 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de cloroquina, respectivamente, tratamiento de combinación con 0,5  $\mu$ M de cloroquina y 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de clorfenesina, respectivamente, tratamiento de combinación con 1  $\mu$ M de cloroquina y 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de clorfenesina, respectivamente o tratamiento de combinación con 5  $\mu$ M de cloroquina y 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de clorfenesina, respectivamente) o clorfenesina y cloropirazina (tratamiento de combinación con 5  $\mu$ M de clorfenesina y 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de cloropirazina, respectivamente) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu$ L de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30 °C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la ecuación 1 anterior.

[0076] Como resultado, cuando se trató de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de cloroquina en combinación con 5  $\mu$ M de clorfenesina (Figura 33), cuando se trató de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina en combinación con 0,5  $\mu$ M de cloroquina (Figura 34), se trató de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina en combinación con 1  $\mu$ M de cloroquina (Figura 35), cuando se trató de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M de clorfenesina en combinación con 5  $\mu$ M de cloroquina (Figura 36), no se observó citotoxicidad significativa en la línea celular de cáncer de páncreas durante 72 horas. Cuando se trató 5  $\mu$ M de clorfenesina en combinación con 1  $\mu$ M a 25  $\mu$ M de cloropirazina (Figura 37), no se observó citotoxicidad significativa en la línea celular de cáncer de páncreas durante 24 horas.

#### 2-2. Ensayo de migración celular

##### 2-2-1. Comparación entre la administración única y el tratamiento de combinación

[0077] El grado de migración de las líneas celulares de cáncer de páncreas Panc-1 y Aspc-1 se confirmó de la misma manera en el Ejemplo 1-2-1 cuando se trataron con clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) solas y se trataron con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación. Específicamente, las líneas celulares de cáncer de páncreas Panc-1 y Aspc-1 se trataron con un control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (5  $\mu$ M), cloroquina (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 25  $\mu$ M), cloropirazina (25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu$ M + 5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M + 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M + 25  $\mu$ M), y clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu$ M + 25  $\mu$ M, 5  $\mu$ M + 50  $\mu$ M), y a continuación se confirmó el grado de migración celular de la misma manera que en el Ejemplo 1-2-1 anterior. Además, se calculó el efecto sinérgico del tratamiento de combinación mediante el índice de combinación (IC) según el tratamiento de la concentración combinada de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina utilizando el software Compusyn.

[0078] Como resultado, la migración de células Panc-1 disminuyó en los grupos a los que se les administró una sola vez clorfenesina, cloroquina y cloropirazina (Figuras 38 y 39), y en el grupo tratado con 5  $\mu$ M de clorfenesina y 10  $\mu$ M de cloroquina, y 5  $\mu$ M de clorfenesina y 25  $\mu$ M o más de cloropirazina, se observó un efecto sinérgico (Figura 39). Además, la migración de células en la línea celular Aspc-1 también disminuyó en los grupos de administración única de clorfenesina, cloroquina y cloropirazina (Figuras 40 y 41), y se observó un efecto sinérgico en la disminución de la migración celular en todos los grupos tratados con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación (Figura 41).

#### 2-3. Ensayo de invasión

[0079] Para confirmar si la clorfenesina (OC-201), la cloroquina (OC-202) y la cloropirazina (OC-203) de la presente invención inhiben las características de las células cancerosas que perforan la membrana delgada que rodea los



tejidos de la célula o degradan la matriz extracelular que llena el espacio intercelular para invadir y hacer metástasis en otras partes, se realizó el ensayo de invasión utilizando matrigel que simula la matriz extracelular.

[0080] Específicamente, las líneas celulares de cáncer de páncreas Panc-1 y MIACaPa2 se suspendieron en RPMI sin suero y se agregaron a  $1 \times 10^5$  células / pocillo en la cámara superior de una cámara transwell de 24 pocillos con una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 8,0  $\mu\text{m}$ , Costar). Se colocó Matrigel (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en el pocillo inferior y cada célula se trató con control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), cloroquina (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), y clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. A continuación, las células se cultivaron durante 18 horas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. A continuación, las células se fijaron con alcohol metílico al 70 % en PBS durante 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células se tiñeron con hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada. Las células no migradas se eliminaron de la superficie superior de la membrana con un hisopo de algodón. Las membranas se extrajeron de la cámara y se fijaron con Gel Mount (Biomed, Foster City, CA, EE. UU.). Las células migradas (células adheridas a la superficie inferior de la membrana) se contaron en un endoscopio seleccionado al azar en un campo de alta potencia (x20). Además, el efecto sinérgico del tratamiento de combinación se calculó mediante el índice de combinación (IC) de acuerdo con la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina utilizando el software Compusyn.

[0081] Como resultado, la invasión de Panc-1 y MIACaPa2 se inhibió en los grupos de administración única de clorfenesina, cloroquina y cloropirazina, tal como se muestra en las Figuras 42 y 44. En ambas líneas celulares de cáncer de páncreas, se demostraron efectos sinérgicos del tratamiento de combinación con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina (Figuras 43 y 45).

### **Ejemplo 3. Confirmación del efecto sobre el cáncer de vías biliares**

#### 3-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular

##### 3-1-1. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante una sola administración

[0082] Para confirmar el efecto de la administración única de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203), respectivamente, sobre la tasa de supervivencia de las células de cáncer de las vías biliares, se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas de células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer de las vías biliares se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con 0  $\mu\text{M}$  (control: tratamiento con DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM (1000  $\mu\text{M}$ ) de clorfenesina (OC-201), 0  $\mu\text{M}$  (control: tratamiento con DMSO), 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de cloroquina (OC-202) y 0  $\mu\text{M}$  (control: tratamiento con DMSO), 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina (OC-203) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30°C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la ecuación 1, tal como se describió anteriormente.

[0083] Como resultado, tal como se muestra en las Figuras 46 a 48, la clorfenesina mostró una citotoxicidad aparente a 1 mM o más después de 48 horas, SNU1079 tratada con cloroquina mostró citotoxicidad a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  o más durante 24 horas y de 25  $\mu\text{M}$  o más después de 48 horas, y la línea celular SNU 308 mostró citotoxicidad a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  o más después de 48 horas. El grupo único de cloropirazina no mostró citotoxicidad ni a dosis altas.

##### 3-1-2. Confirmación de la tasa de supervivencia celular mediante la administración de combinación

[0084] Para confirmar la tasa de supervivencia de células de cáncer de las vías biliares mediante el tratamiento de combinación de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203), se evaluó la tasa de supervivencia celular para las líneas de células de cáncer de las vías biliares SNU1079 y SNU308 mediante el ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada línea celular de cáncer de las vías biliares se inoculó en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se trató previamente con control (tratamiento con DMSO), clorfenesina (OC-201) (5  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (OC-202) en combinación (tratamiento de combinación con 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina y 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  de cloroquina, respectivamente), o clorfenesina y cloropirazina (OC-203) en combinación (tratamiento de combinación con 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina y 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina, respectivamente) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente. Las líneas celulares pretratadas se incubaron con 5 mg/ml de MTT durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30°C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó utilizando la ecuación 1 anterior.

[0085] Como resultado, se observó citotoxicidad en la línea celular de cáncer de las vías biliares cuando se combinaron 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina y 50  $\mu\text{M}$  o más de cloroquina (Figura 49) y cuando se combinaron 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina y 100  $\mu\text{M}$  de cloropirazina (Figura 50).

## 5 3-2. Confirmación de la migración celular

### 3-2-1. Administración única de clorfenesina

[0086] La movilidad de la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 de acuerdo con la concentración de tratamiento de clorfenesina (OC-201) se confirmó mediante el ensayo de migración. Específicamente, la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 se suspendió en RPMI sin suero y se agregó a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en la cámara superior de una cámara Transwell de 24 pocillos con una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 8,0  $\mu\text{m}$ , Costar). Se colocó laminina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en el pocillo inferior y las células se trataron con 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM o 2 mM de clorfenesina. A continuación, las células se cultivaron durante 18 horas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. A continuación, las células se fijaron con alcohol metílico al 70 % en PBS durante 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células se tiñeron con hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada. Las células no migradas se eliminaron de la superficie superior de la membrana con un hisopo de algodón. Las membranas se extrajeron de la cámara y se fijaron con Gel Mount (Biomed, Foster City, CA, EE. UU.). Las células migradas (células adheridas a la superficie inferior de la membrana) se contaron en un endoscopio seleccionado al azar en un campo de alta potencia (x20).

[0087] Como resultado, la migración de las células de cáncer de las vías biliares tratadas con 25  $\mu\text{M}$  o más de clorfenesina disminuyó y, en particular, la disminución de la migración celular fue notable en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  o más (Figuras 51 y 52).

### 25 3-2-2. Administración de combinación

[0088] La movilidad de la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 se confirmó mediante el ensayo de migración cuando las células se trataron con clorfenesina y cloroquina o cloropirazina en combinación. La línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 se trató con control (DMSO), clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), cloroquina (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), y clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ). A continuación, se confirmó el grado de migración celular de la misma manera que en el Ejemplo 3-2-1. Además, se calculó el efecto sinérgico del tratamiento de combinación utilizando el Índice de Combinación (IC) según la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina utilizando el software Compusyn.

[0089] Como resultado, la inhibición de la migración de células de cáncer de las vías biliares aumentó sinérgicamente (efecto de sinergia) cuando se trató con 5  $\mu\text{M}$  de clorfenesina y 5  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$  de cloroquina en combinación (Figuras 53 y 54).

### 40 3-3. Ensayo de invasión

[0090] Para confirmar si el tratamiento único o de combinación de clorfenesina (OC-201), cloroquina (OC-202) y cloropirazina (OC-203) de la presente invención inhibe las características de las células cancerosas que invaden y hacen metástasis en otras partes, la línea celular de cáncer de las vías biliares SNU1079 se trató con control (DMSO), clorfenesina (5  $\mu\text{M}$ ), cloroquina (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ ), cloropirazina (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ), clorfenesina y cloroquina (5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ), y clorfenesina y cloropirazina (5  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$ ), y el ensayo de invasión se realizó de la manera descrita en el Ejemplo 2-3. Además, el efecto sinérgico del tratamiento de combinación se calculó utilizando el Índice de Combinación (IC) de acuerdo con la concentración del tratamiento de combinación de clorfenesina y cloroquina o cloropirazina utilizando el software Compusyn.

[0091] Como resultado, se confirmó que la invasión de células cancerosas del tracto biliar se inhibió tal como se muestra en la Figura 55, y en particular, cuando se utilizaron clorfenesina y cloroquina en combinación, se demostró el efecto sinérgico (Figura 56).

## 55 Ejemplo 4. Confirmación del efecto inhibidor de la metástasis del cáncer a baja concentración

[0092] Para determinar la concentración de clorfenesina no citotóxica, se evaluó la tasa de supervivencia celular mediante un ensayo MTT (Promega, Ltd.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La línea celular CT26 y la línea celular HCT-116 se inocularon en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo. Después del pretratamiento o de la ausencia de tratamiento con clorfenesina (100 ppm, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM y 10 mM), las células se incubaron con 5 mg/mL de MTT durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de solubilización y la solución de parada, seguido de una incubación a 30 °C durante 4 horas. La absorbancia de la solución de reacción se midió a 570 nm. La tasa de supervivencia celular se calculó mediante la ecuación 1 anterior. Tal como se muestra en la Figura 57, se confirmó que tanto las células CT26 como las células HCT-116 no eran citotóxicas en el intervalo de concentración de 1  $\mu\text{M}$  a 1 mM.

[0093] Aunque 1  $\mu\text{M}$  de clorfenesina es menor que la concentración que muestra un efecto de relajación muscular, no es citotóxica. Por lo tanto, con el fin de evaluar si la clorfenesina con la concentración baja que no tiene actividad contra el cáncer ha inhibido los efectos inhibidores de la metástasis de células cancerosas, se realizaron los siguientes experimentos.

#### 4-1-1. Confirmación de la inhibición de la migración celular

##### 4-1-1-1. Ensayo de migración

[0094] El ensayo de migración celular se realizó utilizando una cámara transwell de 24 pocillos con una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 8,0  $\mu\text{m}$ , Costar). Las células de cáncer colorrectal CT26 y HCT116 se suspendieron en RPMI sin suero y se añadieron a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en la cámara superior. Se colocó laminina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en el pocillo inferior y las células se cultivaron durante 8 horas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  a 37 °C y se dejó que migraran. A continuación, las células se fijaron con alcohol metílico al 70 % en PBS durante 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células se tiñeron con hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada. Las células no migradas se extrajeron de la superficie superior de la membrana con un hisopo de algodón. Las membranas se extrajeron de la cámara y se fijaron con Gel Mount (Biomedica, Foster City, CA, EE. UU.). Las células migradas (células adheridas a la superficie inferior de la membrana) se contaron en un endoscopio seleccionado aleatoriamente en un campo de alta potencia (x20).

[0095] Como resultado, tal como se muestra en la Figura 58, se confirmó que al tratarlas con clorfenesina a baja concentración (1  $\mu\text{M}$ ), la capacidad de invasión y migración de las células se redujo significativamente en comparación con el control.

##### 4-1-1-2. Ensayo de cicatrización de heridas

[0096] Se realizó un análisis de cicatrización de heridas para medir la motilidad celular. En primer lugar, se añadió la línea celular de cáncer colorrectal CT26 a RPMI suplementado con 10 % de FBS. Después de 24 horas, las células se inocularon en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a la concentración en la que se alcanzó una confluencia del 70 % al 80 % mediante una monocapa. Se aplicó un raspado cuidadoso y lento a la monocapa con una nueva punta de pipeta amarilla de 200  $\mu\text{l}$  a través del centro del pocillo. La distancia de separación resultante fue igual al diámetro exterior de las puntas. Después del raspado, la placa se lavó cuidadosamente dos veces con medio para extraer las células separadas. Después de la incubación de las células durante 24 horas en presencia o ausencia de clorfenesina (1  $\mu\text{M}$ ), se tomó una fotografía de las monocapas teñidas con un microscopio.

[0097] Como resultado, tal como se muestra en la Figura 59, se confirmó que la movilidad de la línea celular CT26 se redujo mediante el tratamiento con clorfenesina (1  $\mu\text{M}$ ). Este es el resultado de demostrar que afecta la inhibición de la metástasis de células cancerosas incluso a una concentración baja que es incapaz de matar células cancerosas.

##### 4-1-2. Confirmación de la inhibición *in vivo* de la metástasis del cáncer

[0098] El efecto inhibitorio de la clorfenesina sobre la proliferación tumoral se confirmó mediante experimentos con animales. Específicamente, se inocularon subcutáneamente 60 ratones Balb/c una vez con 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células CT26 ( $1 \times 10^7$  células /mL) para inducir tumores, produciendo así un modelo animal de xenoinjerto. Durante 5 semanas a partir de 3 días después de la inoculación de las células cancerosas, se administró clorfenesina sola o en combinación con fluorouracilo (5' FU), que es un fármaco contra el cáncer. En primer lugar, para la administración combinada con fluorouracilo, se administró por vía abdominal a 11 modelos animales 25 mg/kg de fluorouracilo (5 veces a la semana) y 10 mg/kg de clorfenesina (3 veces a la semana) en combinación durante 5 semanas. Para la administración única de clorfenesina, se administró por vía abdominal a 10 modelos animales 10 mg/kg de clorfenesina (3 veces por semana) durante 5 semanas o se administró por vía oral a 14 modelos animales 20 mg/kg de clorfenesina (5 veces por semana) durante 5 semanas. A 14 modelos animales se les administró la misma dosis de PBS que la clorfenesina como control negativo. A 14 modelos animales se les administró 25 mg/kg de fluorouracilo, agente contra el cáncer, solo (5 veces por semana) como control positivo. El peso corporal de los modelos animales se midió una vez por semana y el tamaño del tumor se midió una vez por semana desde el día de la administración del fármaco. Después de 6 semanas, los modelos animales se anestesiaron con éter y se recogieron los tumores y los pulmones.

[0099] Como resultado, tal como se muestra en la Figura 60, se confirmó que el grupo tratado con clorfenesina no mostró metástasis de cáncer en los pulmones en comparación con los grupos de control. Además, tal como se muestra en la Figura 61, se confirmó que el grupo tratado con clorfenesina mostró una reducción del tamaño del tumor en los animales tratados con clorfenesina a 20 mg/kg en comparación con los grupos de control. Esto sugiere que la clorfenesina es un regulador negativo tanto del crecimiento del tumor como del potencial metastásico.

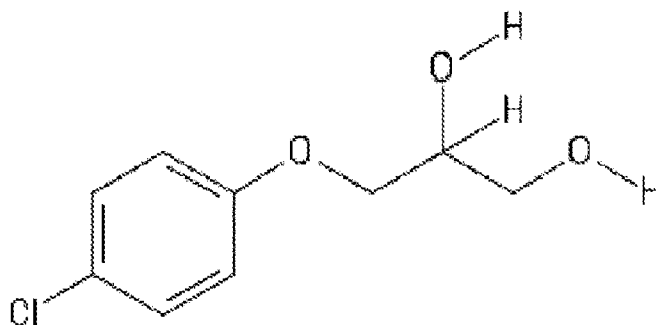
[0100] En esta memoria descriptiva, las realizaciones de ejemplo de la presente invención se han clasificado en la primera, segunda y tercera realizaciones de ejemplo y se han descrito para mayor concisión. Sin embargo, las etapas

o funciones respectivas de una realización de ejemplo se pueden combinar con los de otra realización de ejemplo para implementar otra realización de ejemplo de la presente invención.

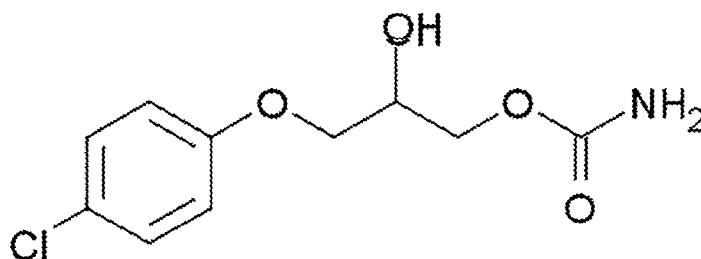
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer, comprendiendo la composición clorfenesina representada por la siguiente Fórmula química 1, carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como principio activo, en la que el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares.

[Fórmula Química 1]



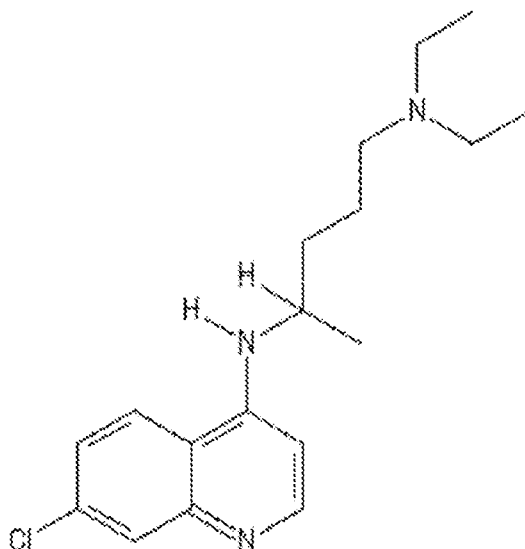
[Fórmula Química 4]



2. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 1, en la que la composición incluye 1) clorfenesina o carbamato de clorfenesina y cloroquina; o 2) clorfenesina o carbamato de clorfenesina y cloropirazina como principio activo.

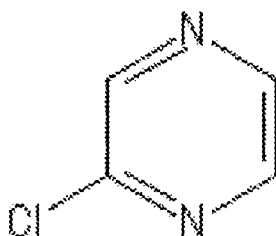
3. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 2, en la que la cloroquina está representada por la siguiente Fórmula Química 2:

[Fórmula Química 2]



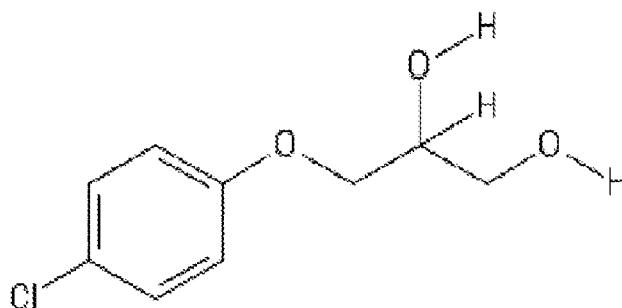
- 5 4. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 2, en la que la cloropirazina está representada por la siguiente Fórmula química 3:

[Fórmula Química 3]

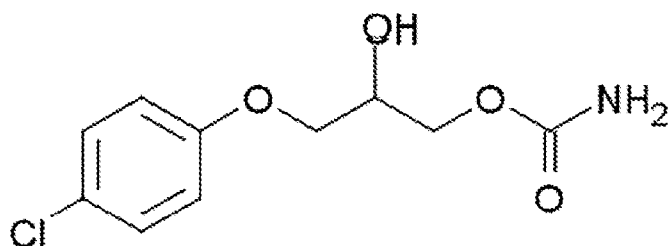


- 10 5. Composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la proliferación y metástasis del cáncer, comprendiendo la composición clorfenesina representada por la siguiente Fórmula química 1, carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como principio activo, en la que el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas o cáncer de las vías biliares.

[Fórmula Química 1]



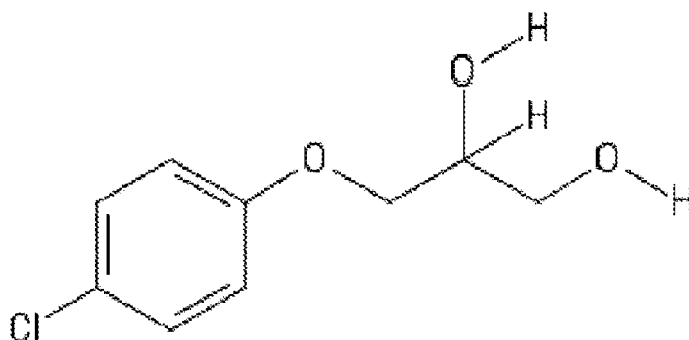
[Fórmula Química 4]



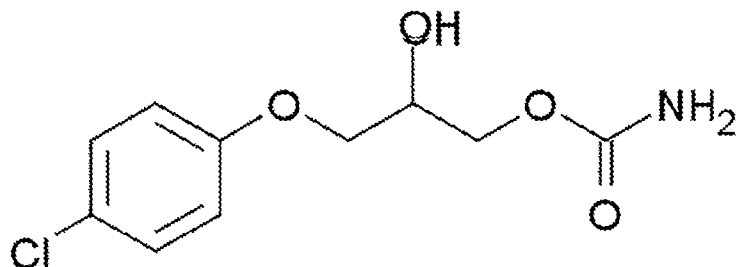
6. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 5, en la que la composición incluye 1) clorfenesina o carbamato de clorfenesina y cloroquina; o 2) clorfenesina o carbamato de clorfenesina y clorpirazina como principio activo.

7. Adyuvante contra el cáncer que incluye 1) clorfenesina representada por la siguiente Fórmula química 1, carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y cloroquina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; o 2) clorfenesina representada por la siguiente Fórmula química 1, carbamato de clorfenesina representado por la siguiente Fórmula química 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y clorpirazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como principio activo.

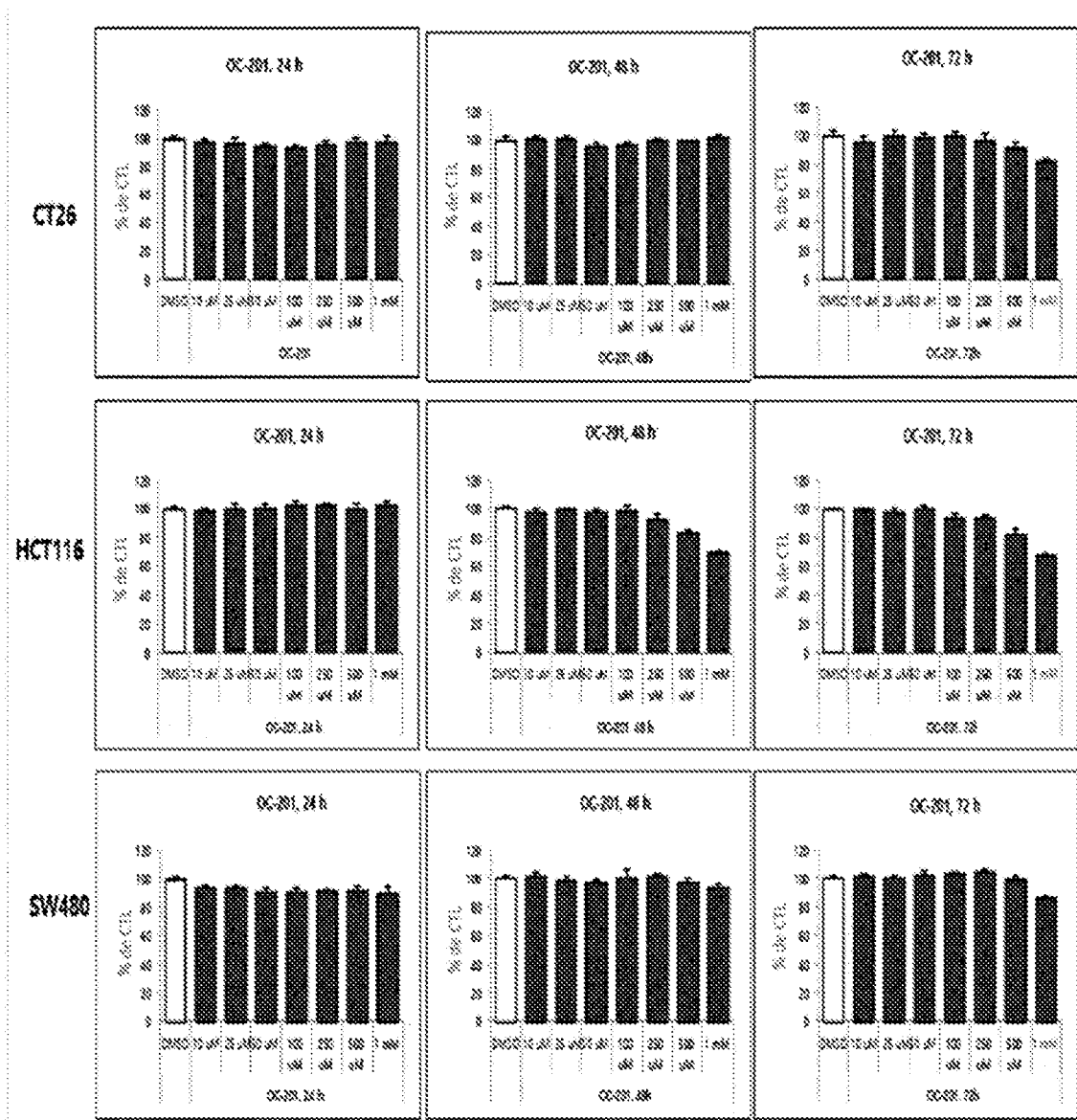
[Fórmula Química 1]



[Fórmula Química 4]

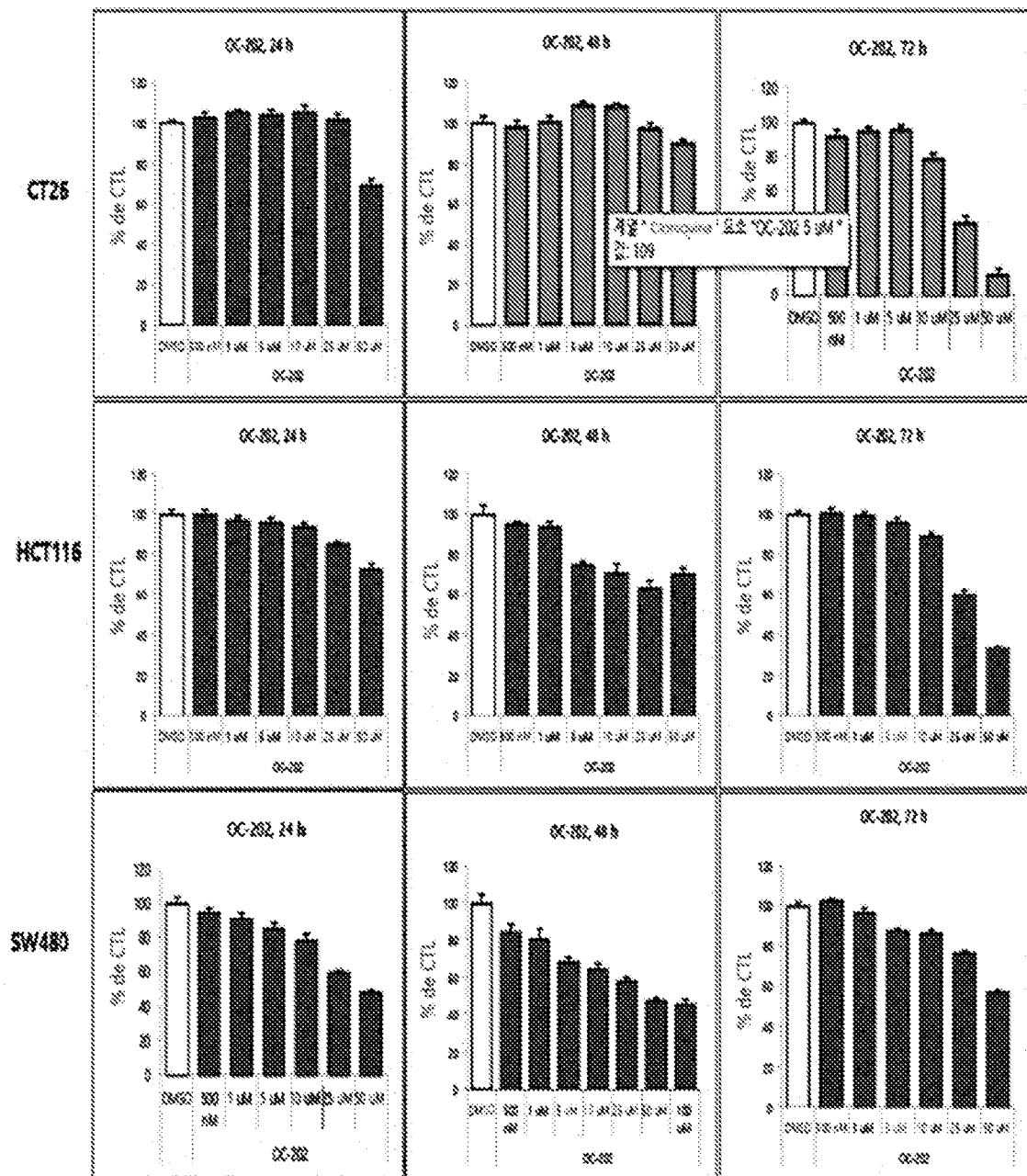


[Figura 1]

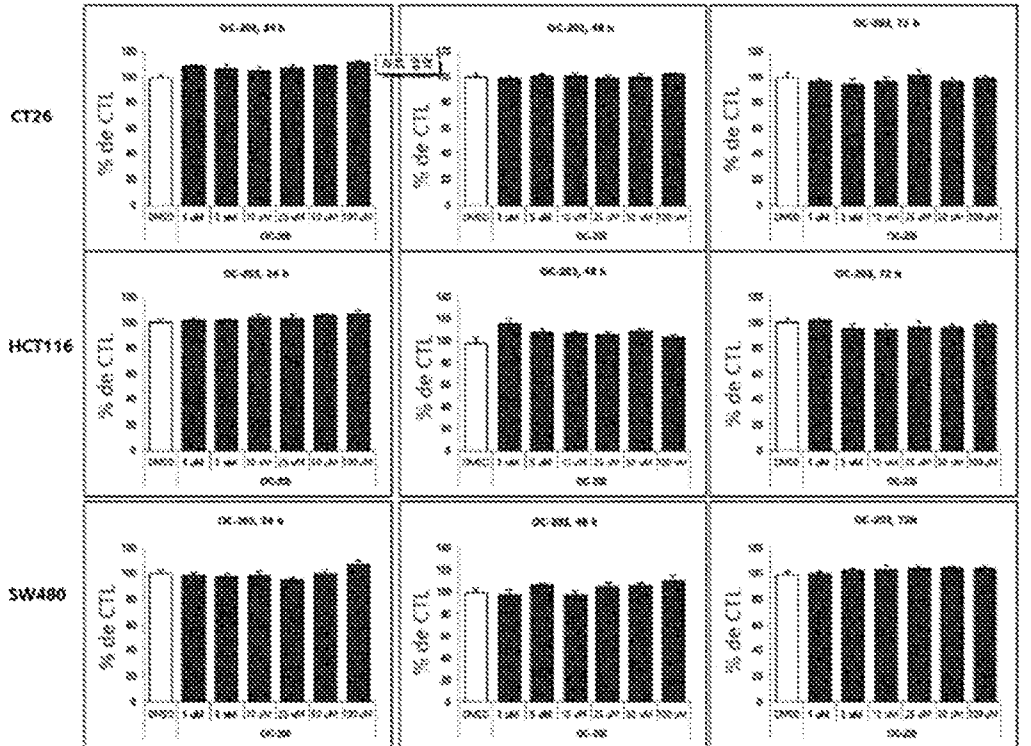




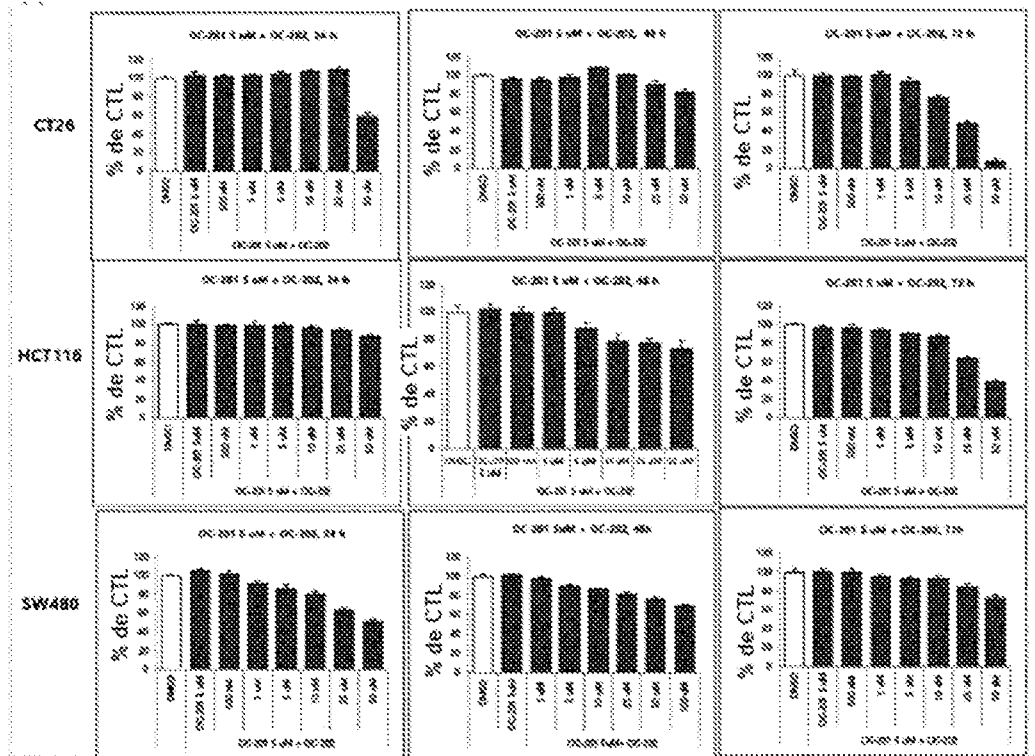
[Figura 2]



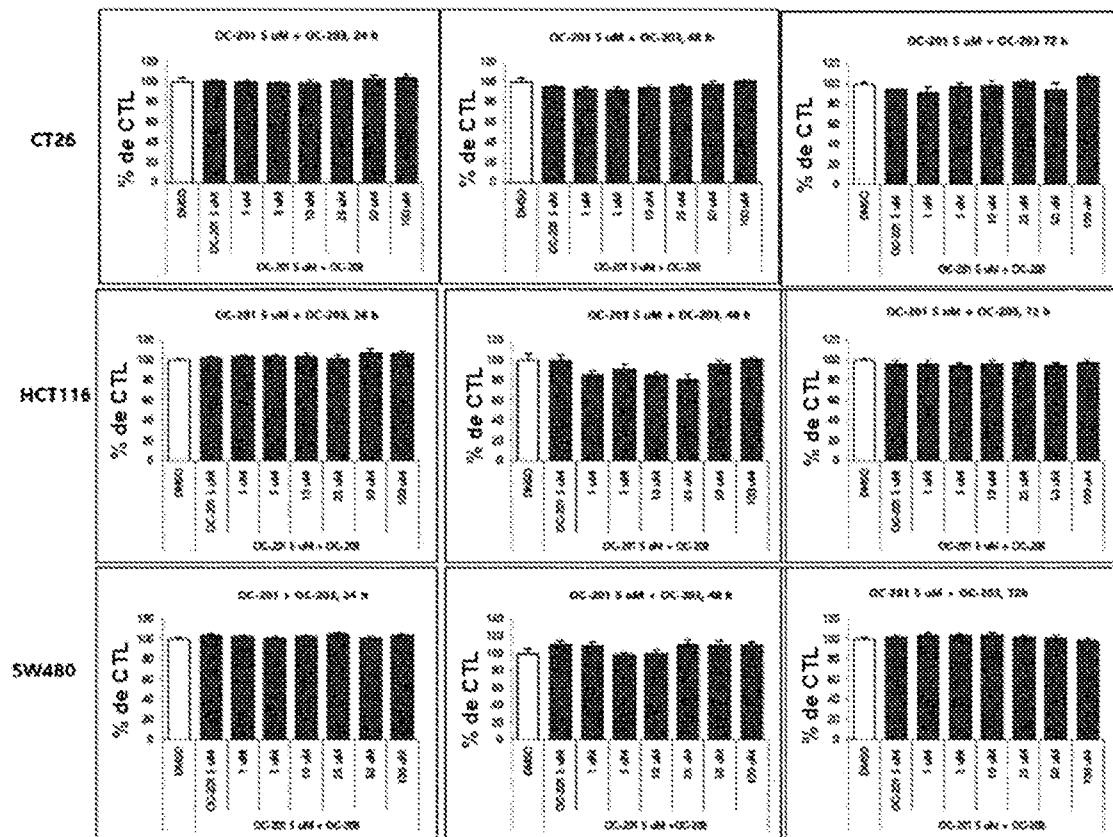
[Figura 3]



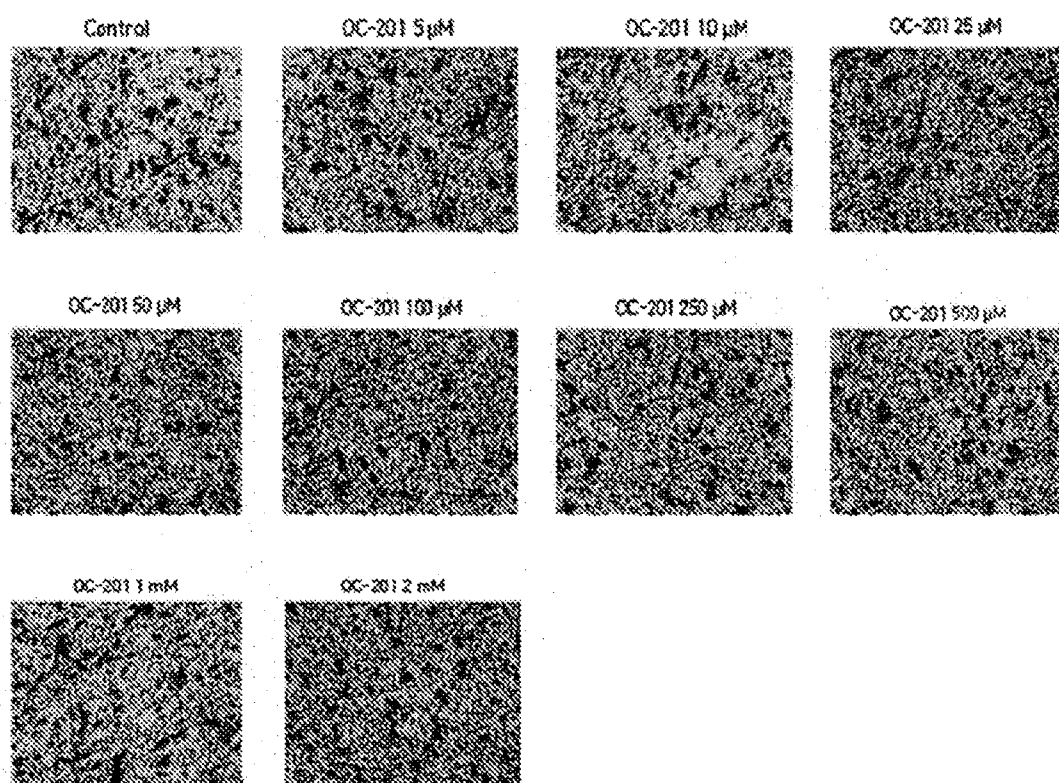
[Figura 4]



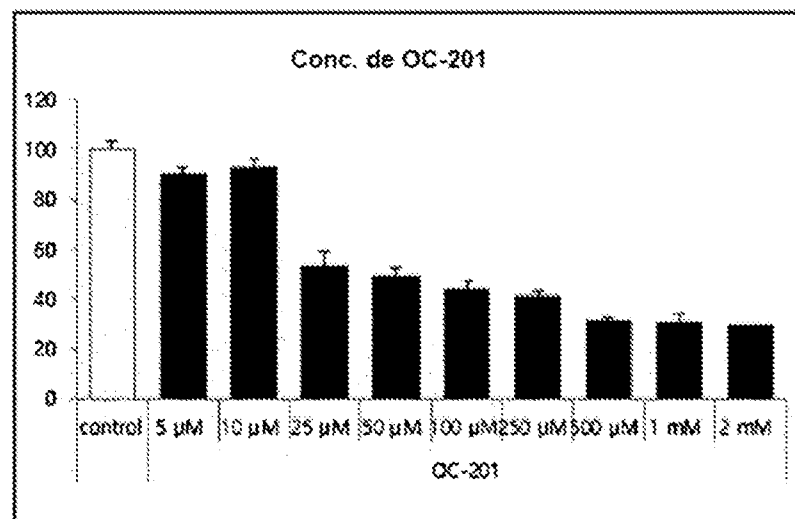
[Figura 5]



[Figura 6]

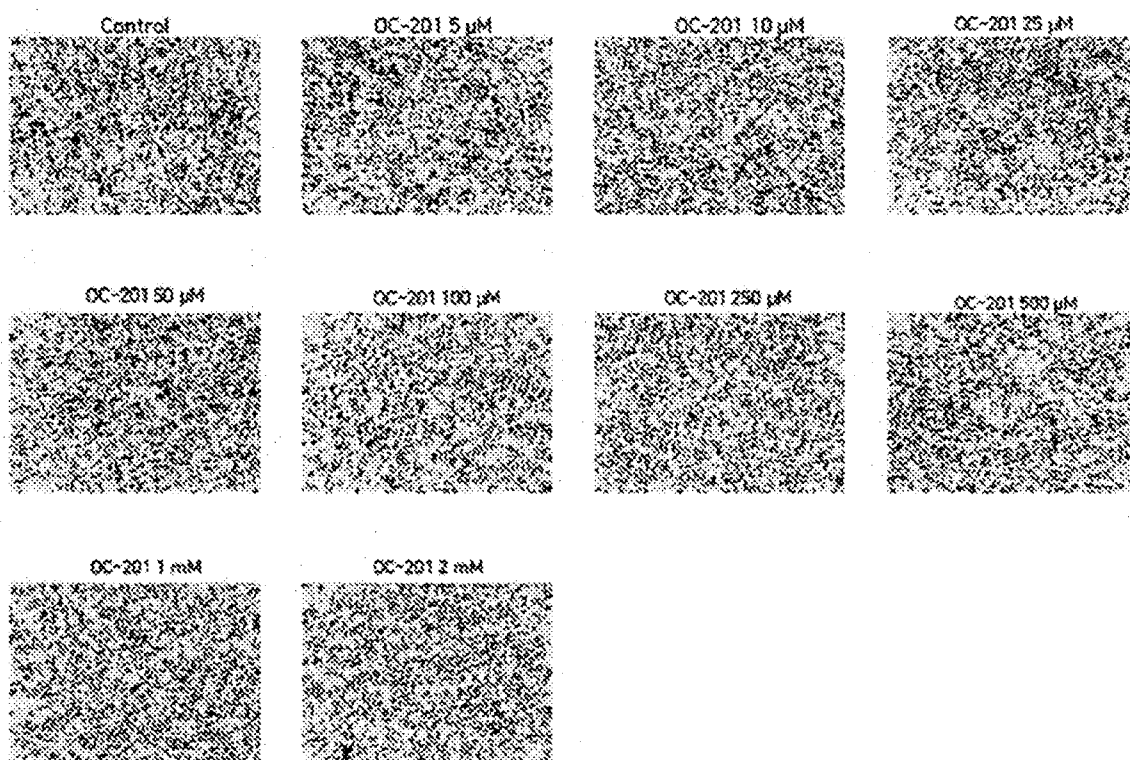


[Figura 7]

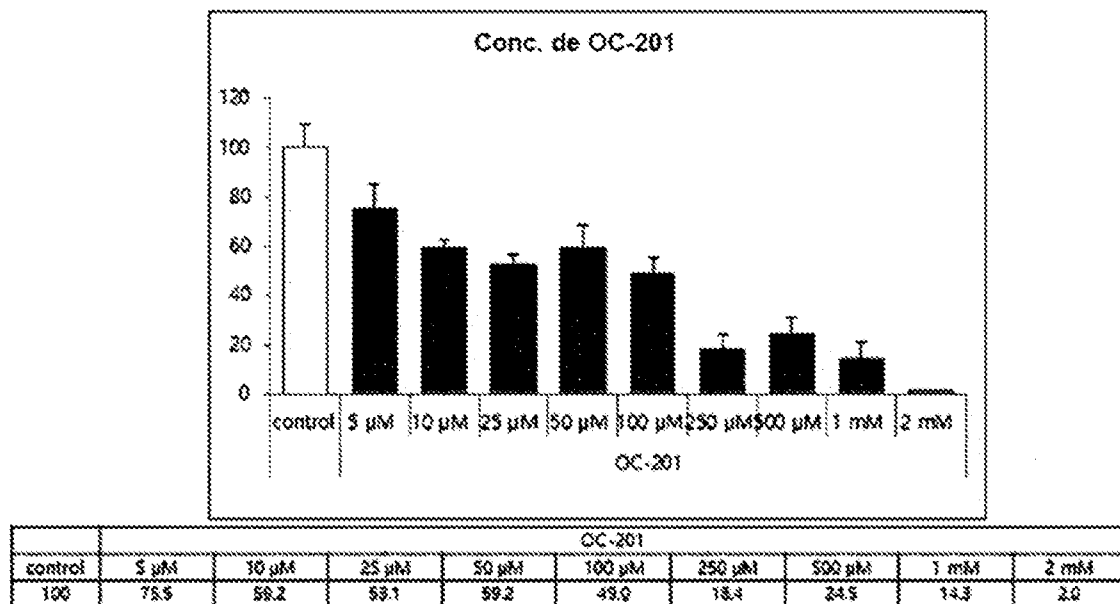


|         | OC-201 |       |       |       |        |        |        |      |      |
|---------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|------|------|
| control | 5 µM   | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 250 µM | 500 µM | 1 mM | 2 mM |
| 100     | 90.6   | 92.8  | 53.6  | 49.3  | 44.2   | 41.3   | 31.9   | 31.2 | 29.7 |

[Figura 8]

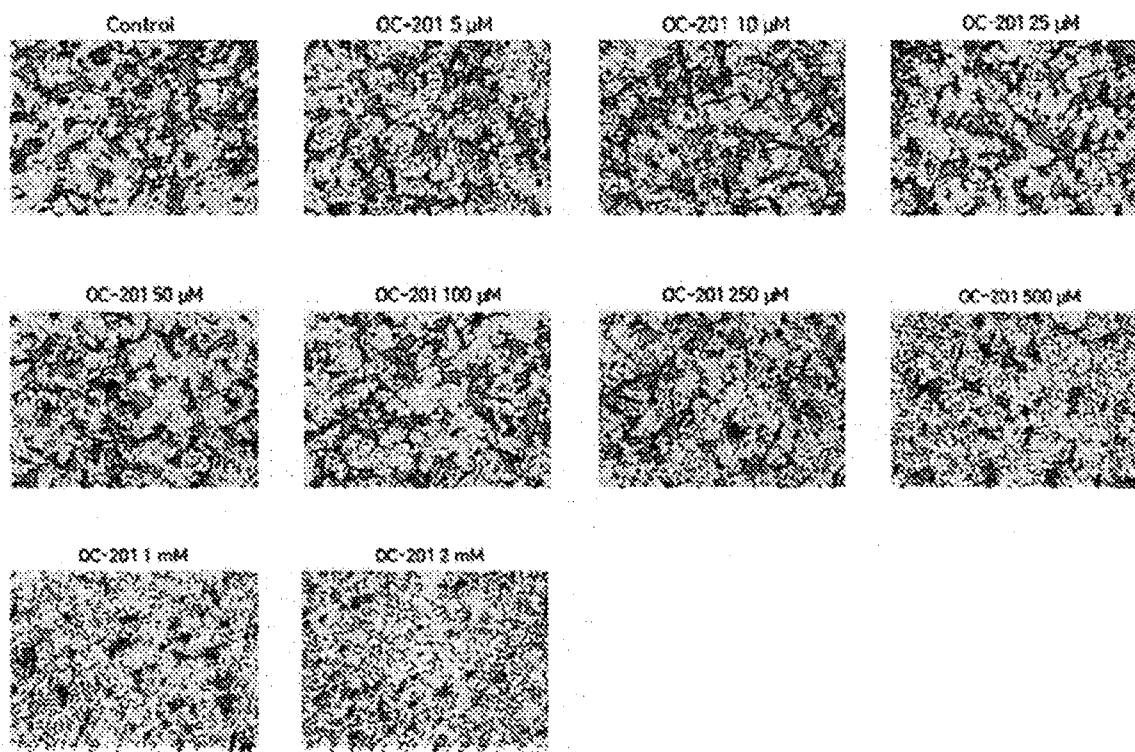


[Figura 9]

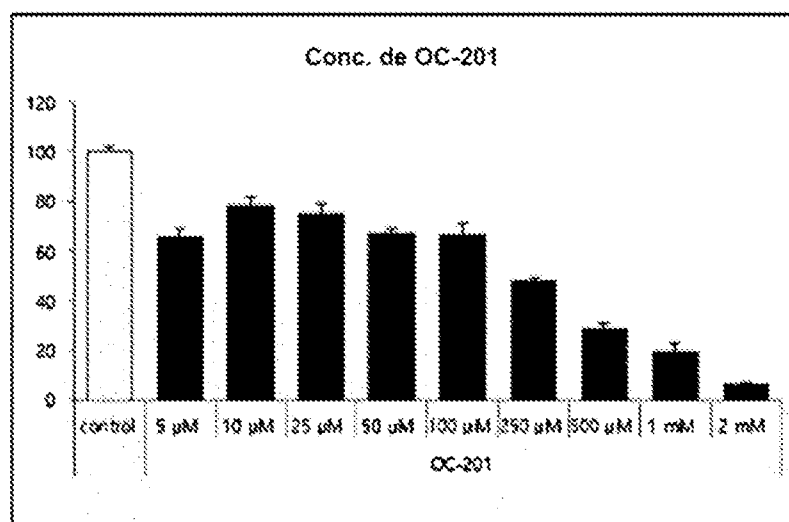




[Figura 10]



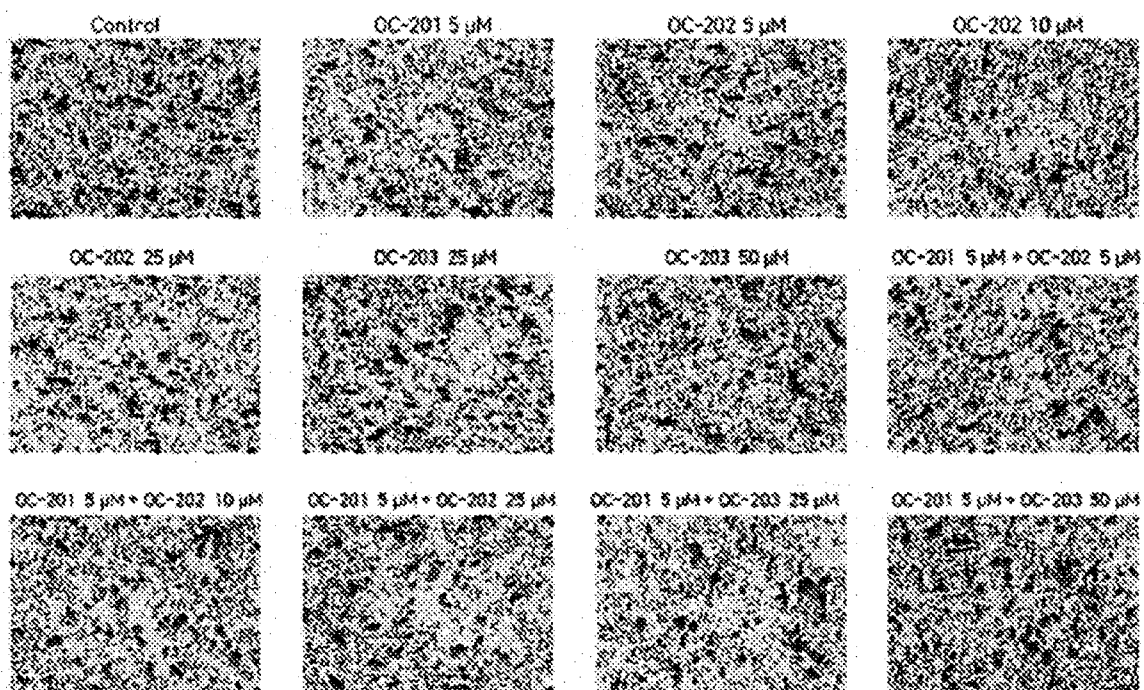
[Figura 11]



|         | OC-201 |       |       |       |        |        |        |      |      |
|---------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|------|------|
| control | 5 µM   | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 250 µM | 500 µM | 1 mM | 2 mM |
| 100     | 65.9   | 78.2  | 74.9  | 67.3  | 66.8   | 48.3   | 28.9   | 19.4 | 6.5  |

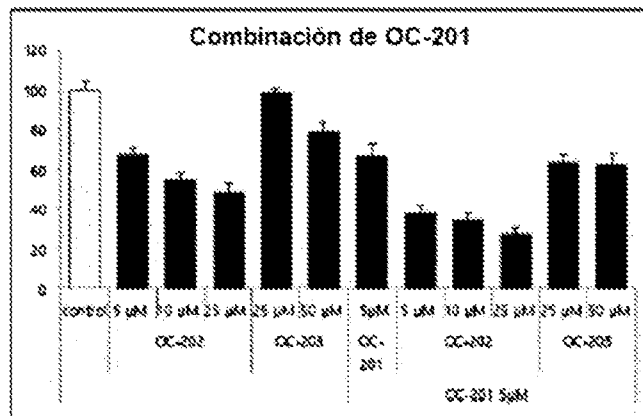
[Figura 12]

**SW480**



[Figura 13]

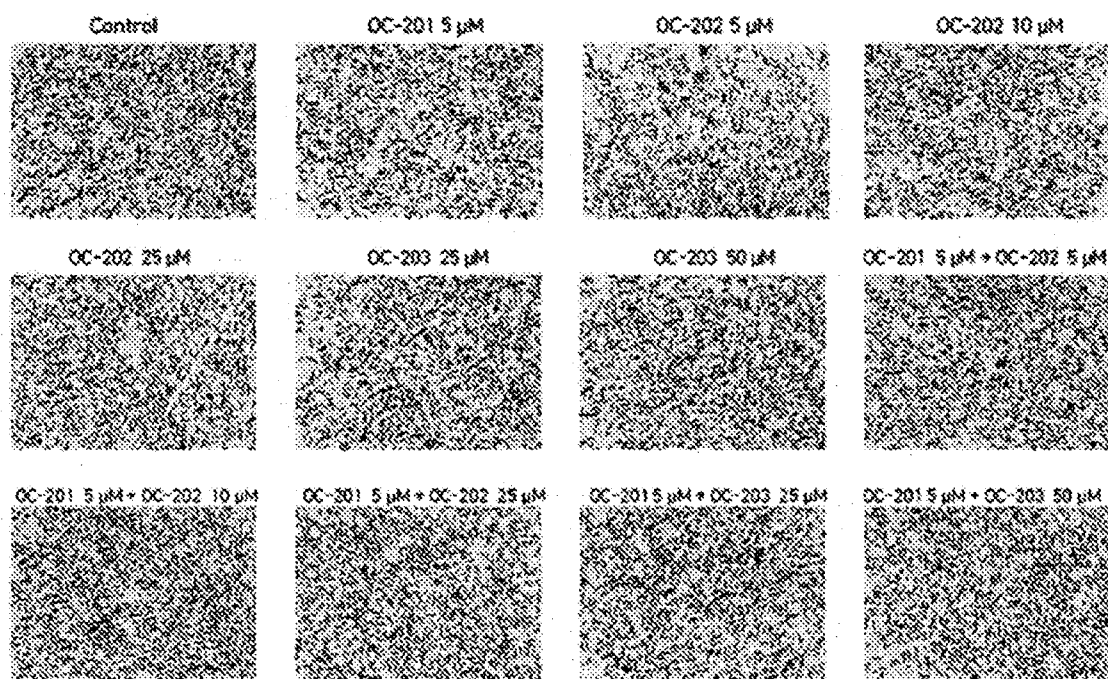
SW480



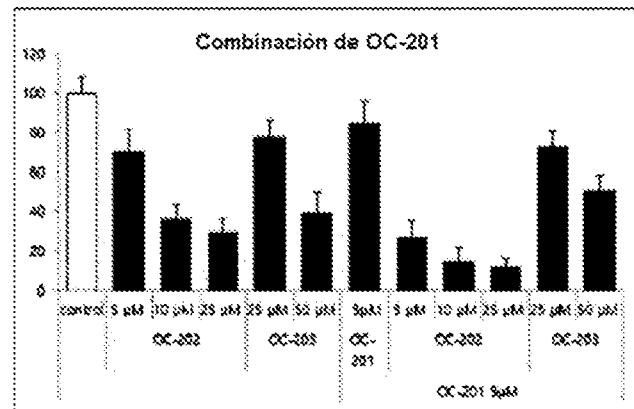
| OC-201 5µM |      |       |        |       |       |        |      |       |        |       |       |
|------------|------|-------|--------|-------|-------|--------|------|-------|--------|-------|-------|
| OC-202     |      |       | OC-203 |       |       | OC-201 |      |       | OC-202 |       |       |
| control    | 5 µM | 10 µM | 25 µM  | 25 µM | 50 µM | 5 µM   | 5 µM | 10 µM | 25 µM  | 25 µM | 50 µM |
| 100        | 67.9 | 55.2  | 48.5   | 98.5  | 79.1  | 87.2   | 38.1 | 33.1  | 27.6   | 64.2  | 82.7  |

[Figura 14]

HCT116



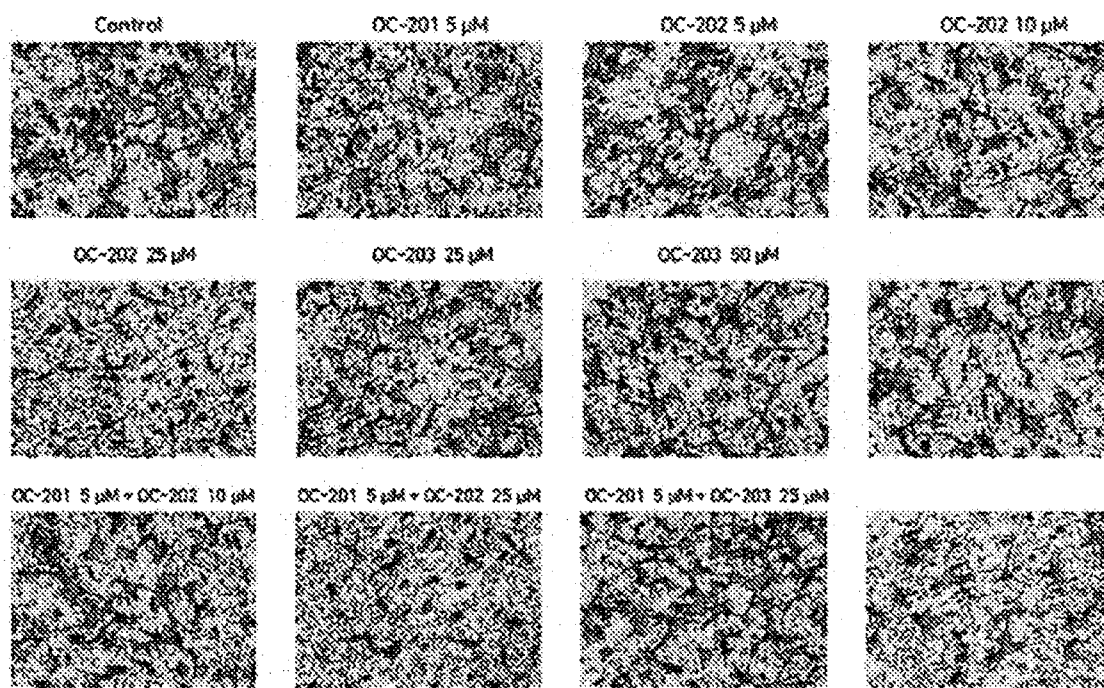
[Figura 15]

HCT116

|         | OC-202    |            |            |  | OC-203     |            | OC-201 SubA |            |            |      | OC-203     |            |
|---------|-----------|------------|------------|--|------------|------------|-------------|------------|------------|------|------------|------------|
| Control | 5 $\mu$ M | 10 $\mu$ M | 25 $\mu$ M |  | 25 $\mu$ M | 50 $\mu$ M | 5 $\mu$ M   | 10 $\mu$ M | 25 $\mu$ M |      | 25 $\mu$ M | 50 $\mu$ M |
| 100     | 75.7      | 36.8       | 26.3       |  | 79.0       | 39.0       | 85.4        | 26.8       | 14.6       | 12.2 | 73.2       | 51.2       |

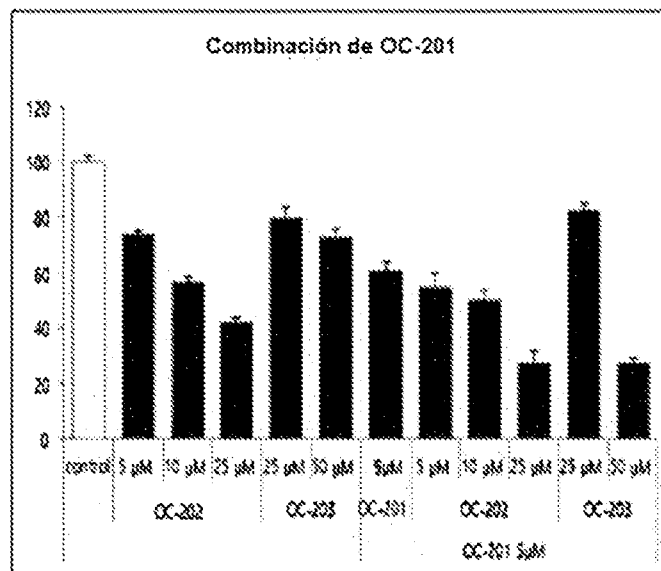
[Figura 16]

CT26



[Figura 17]

CT26



|         |      |       |        |       |       | OC-201 5µM |        |       |       |        |       |
|---------|------|-------|--------|-------|-------|------------|--------|-------|-------|--------|-------|
| OC-202  |      |       | OC-203 |       |       | OC-201     | OC-202 |       |       | OC-203 |       |
| control | 5 µM | 10 µM | 25 µM  | 25 µM | 50 µM | 5 µM       | 5 µM   | 10 µM | 25 µM | 25 µM  | 50 µM |
| 100     | 74.0 | 55.8  | 41.9   | 79.3  | 72.7  | 61.2       | 55.1   | 49.8  | 28.9  | 82.4   | 26.9  |



[Figura 18]

**Sinergismo ( $IC < 1$ )**

Mayor que el efecto aditivo esperado

**Efecto aditivo ( $IC = 1$ )**

El efecto combinado predicho por el principio de la ley de acción de masas en ausencia de sinergismo o antagonismo

**Antagonismo ( $IC > 1$ )**

Menor que el efecto aditivo esperado

Datos IC para la comb. de fármacos: CPN+CQ (CPN+CQ) (1:1)

 $f_a$  Valor IC Dosis total

|      |         |         |
|------|---------|---------|
| 0.05 | 0.16976 | 2675.73 |
| 0.1  | 0.14389 | 496.212 |
| 0.15 | 0.12981 | 174.824 |
| 0.2  | 0.12016 | 79.7062 |
| 0.25 | 0.11279 | 41.6633 |
| 0.3  | 0.10662 | 23.6392 |
| 0.35 | 0.10155 | 14.1283 |
| 0.4  | 0.09667 | 8.72827 |
| 0.45 | 0.09237 | 5.50003 |
| 0.5  | 0.08835 | 3.49817 |
| 0.55 | 0.08451 | 2.22491 |
| 0.6  | 0.08075 | 1.40202 |
| 0.65 | 0.07703 | 0.86615 |
| 0.7  | 0.07348 | 0.51367 |
| 0.75 | 0.07043 | 0.29372 |
| 0.8  | 0.06789 | 0.15353 |
| 0.85 | 0.06534 | 0.07000 |
| 0.9  | 0.06272 | 0.02466 |
| 0.95 | 0.06033 | 0.00467 |
| 0.97 | 0.05942 | 0.00138 |

Datos IC para la comb. de fármacos: CPN+CP (CPN+CP) (1:1)

 $f_a$  Valor IC Dosis total

|      |          |          |
|------|----------|----------|
| 0.05 | 2.48E11  | 6.88E15  |
| 0.1  | 2.65E10  | 6.24E12  |
| 0.15 | 3.80E9   | 8.18E10  |
| 0.2  | 1.61E77  | 3.129E9  |
| 0.25 | 1.170408 | 2.112E8  |
| 0.3  | 1.18075  | 2.004E7  |
| 0.35 | 1.47011  | 2.560786 |
| 0.4  | 2092.91  | 319100   |
| 0.45 | 322.805  | 46830.2  |
| 0.5  | 51.7014  | 7143.42  |
| 0.55 | 9.28040  | 1089.65  |
| 0.6  | 1.27729  | 159.914  |
| 0.65 | 0.23702  | 21.6150  |
| 0.7  | 37.1641  | 2.54606  |
| 0.75 | 53395.7  | 0.24163  |
| 0.8  | 2.21338  | 0.01631  |
| 0.85 | 5.29E12  | 6.24E-4  |
| 0.9  | 3.45E18  | 8.17E-6  |
| 0.95 | 8.52E27  | 7.44E-9  |
| 0.97 | 4.11E34  | 5.1E-11  |

Valores de IC para puntos experimentales reales:

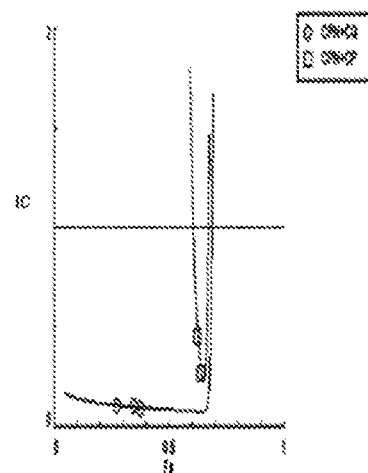
| Dosis total | $f_a$ | Valor IC |
|-------------|-------|----------|
| 10.0        | 0.381 | 0.05415  |
| 15.0        | 0.351 | 0.10857  |
| 30.0        | 0.276 | 0.10664  |

Valores de IC para puntos experimentales reales:

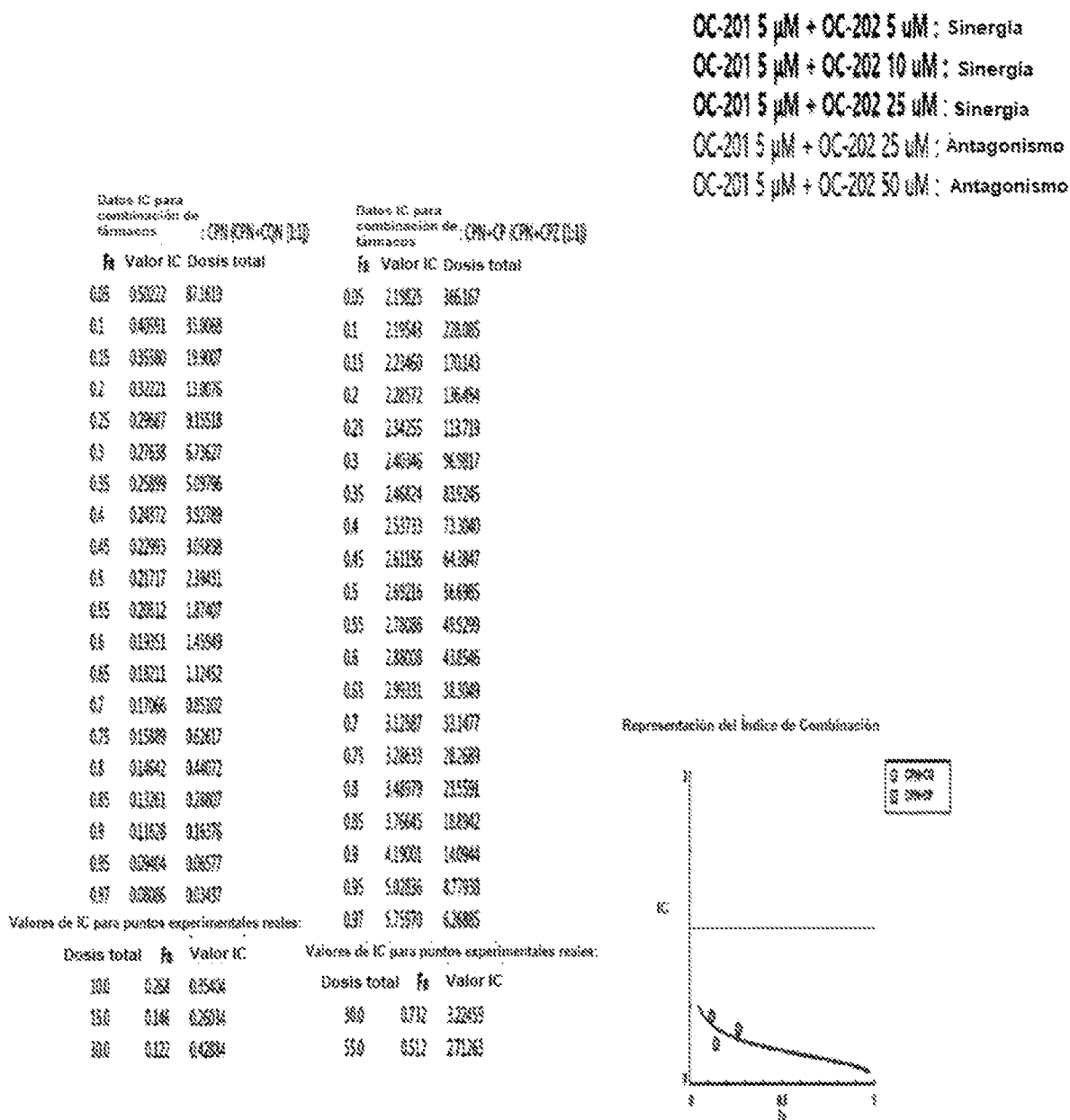
| Dosis total | $f_a$ | Valor IC |
|-------------|-------|----------|
| 30.0        | 0.642 | 0.26846  |
| 55.0        | 0.637 | 0.45440  |

OC-201 5  $\mu$ M + OC-202 5  $\mu$ M : Sinergia  
 OC-201 5  $\mu$ M + OC-202 10  $\mu$ M : Sinergia  
 OC-201 5  $\mu$ M + OC-202 25  $\mu$ M : Sinergia  
 OC-201 5  $\mu$ M + OC-203 25  $\mu$ M : Sinergia  
 OC-201 5  $\mu$ M + OC-203 50  $\mu$ M : Sinergia

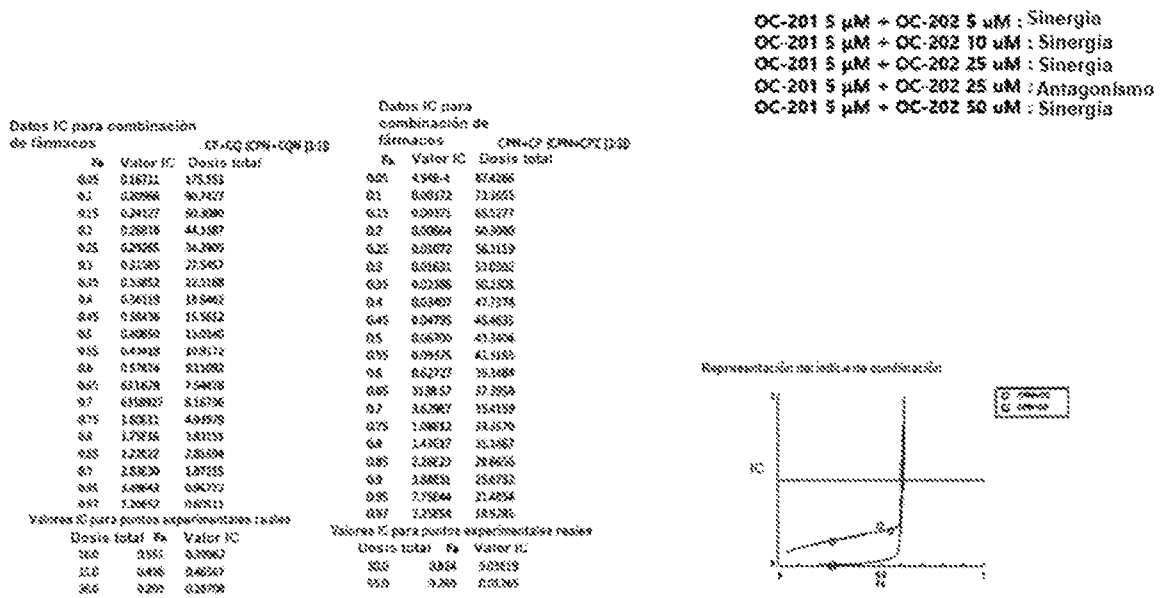
Representación del Índice de Combinación



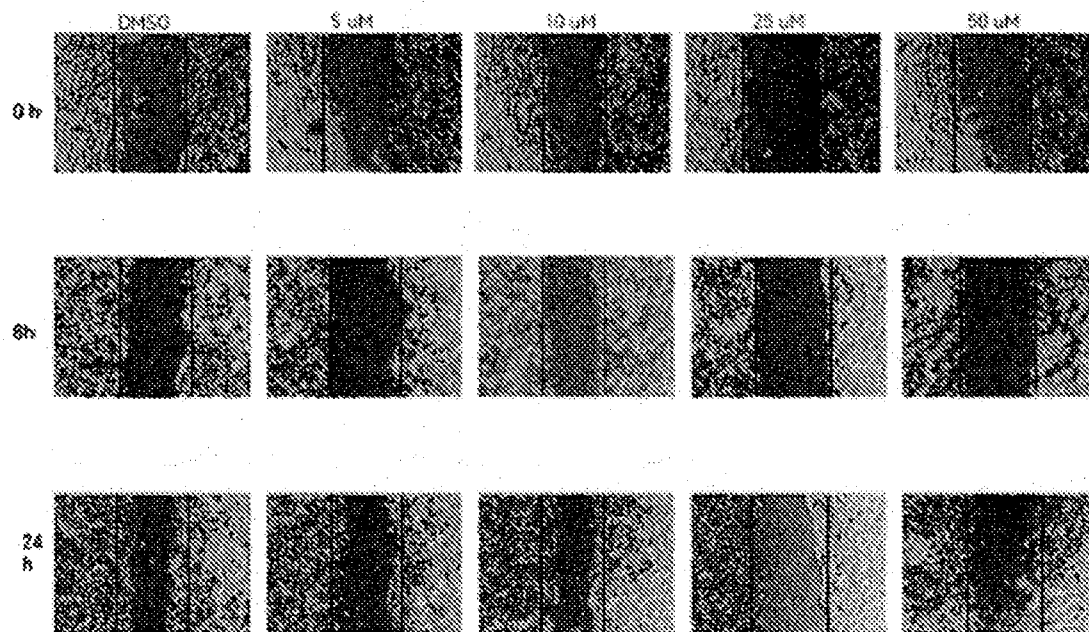
[Figura 19]



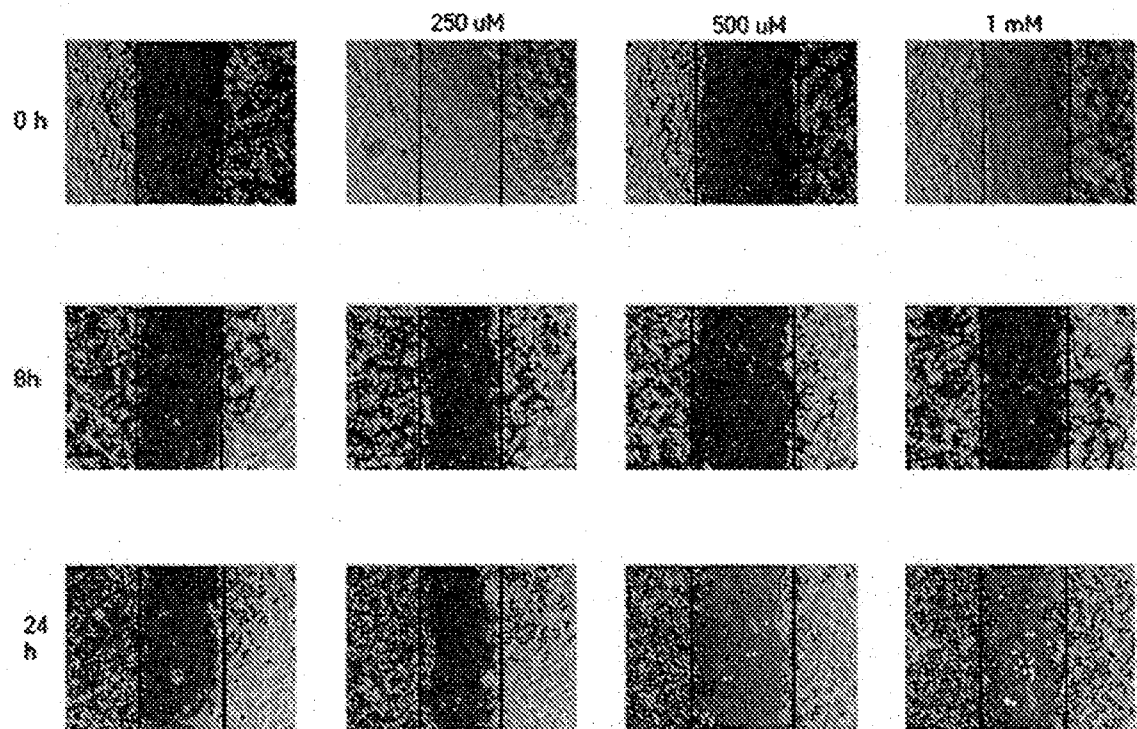
[Figura 20]



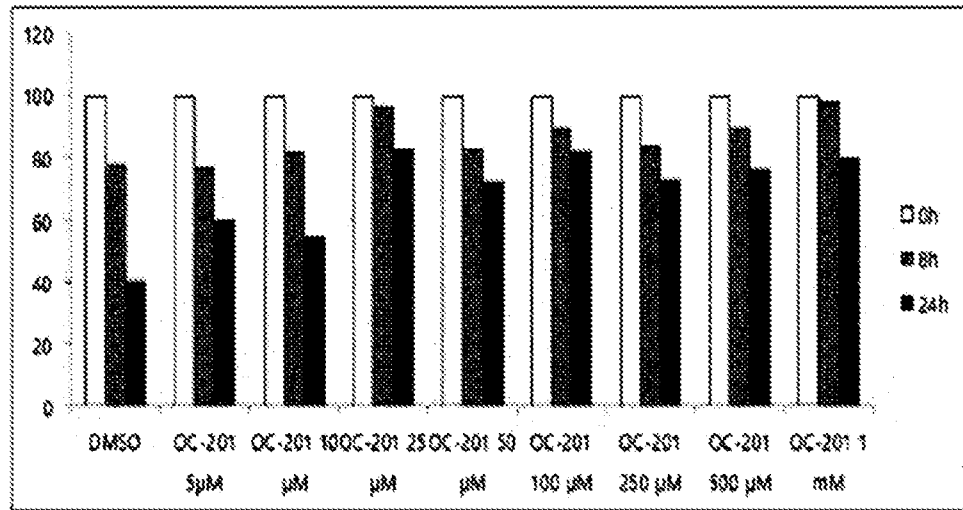
[Figura 21]



[Figura 22]



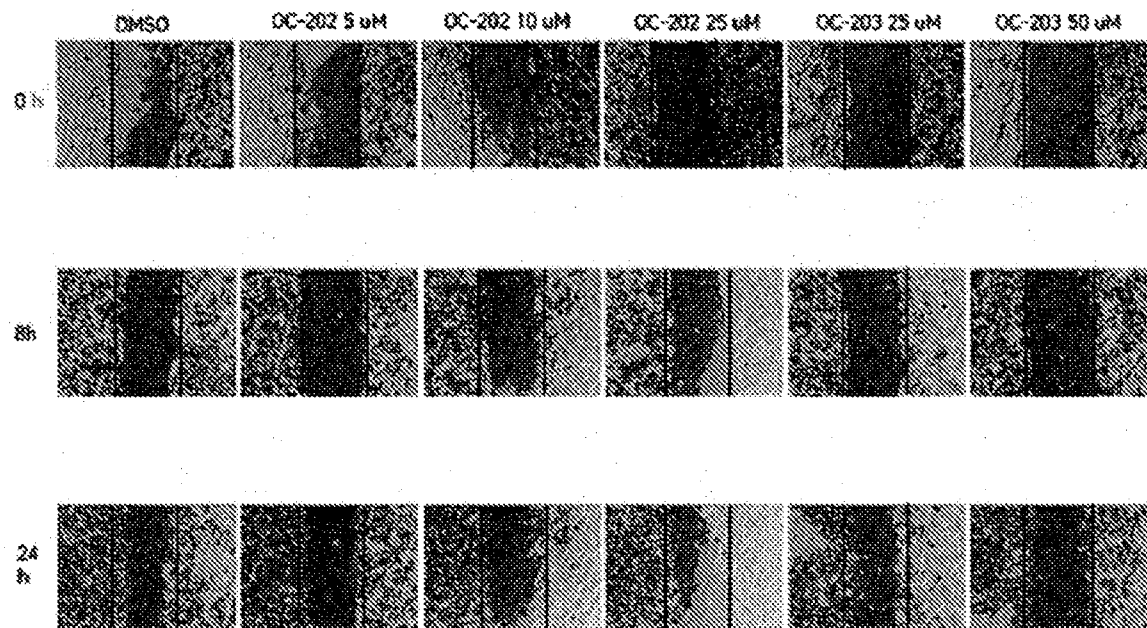
[Figura 23]



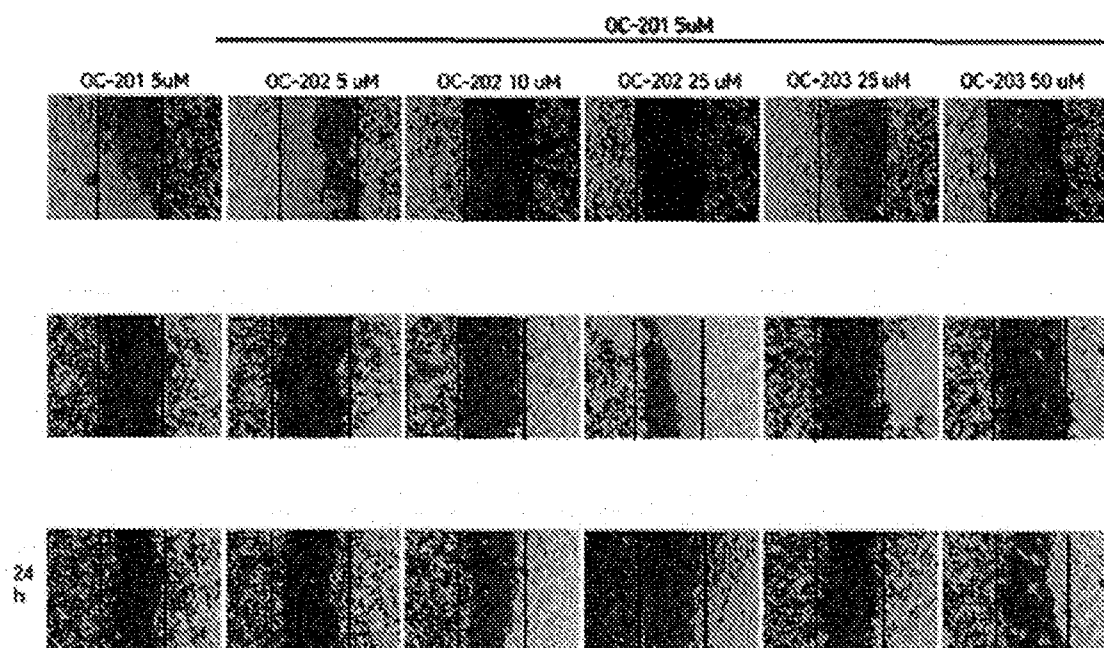
|     | DMSO | OC-201 5µM | OC-201 10 µM | OC-201 25 µM | OC-201 50 µM | OC-201 100 µM | OC-201 250 µM | OC-201 500 µM | OC-201 1 mM |
|-----|------|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| 0h  | 100  | 100        | 100          | 100          | 100          | 100           | 100           | 100           | 100         |
| 8h  | 77.6 | 77.5       | 81.5         | 96.1         | 83.0         | 89.4          | 83.8          | 89.4          | 97.9        |
| 24h | 40.0 | 60.0       | 54.8         | 83.1         | 72.5         | 82.2          | 72.6          | 75.9          | 80.3        |

Tasa de migración = (área media ocupada por las células/área media original) x 100

[Figura 24]

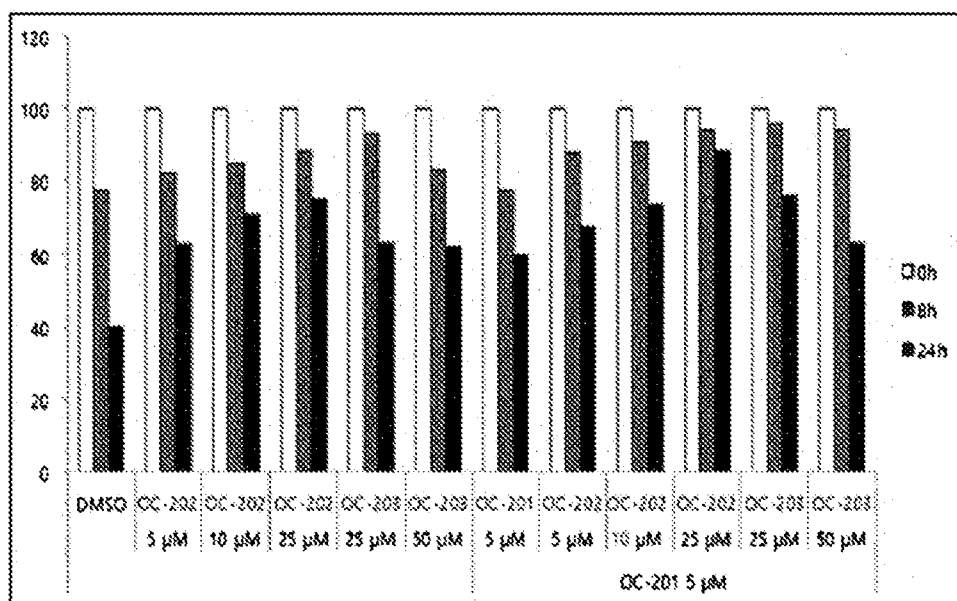


[Figura 25]





[Figura 26]

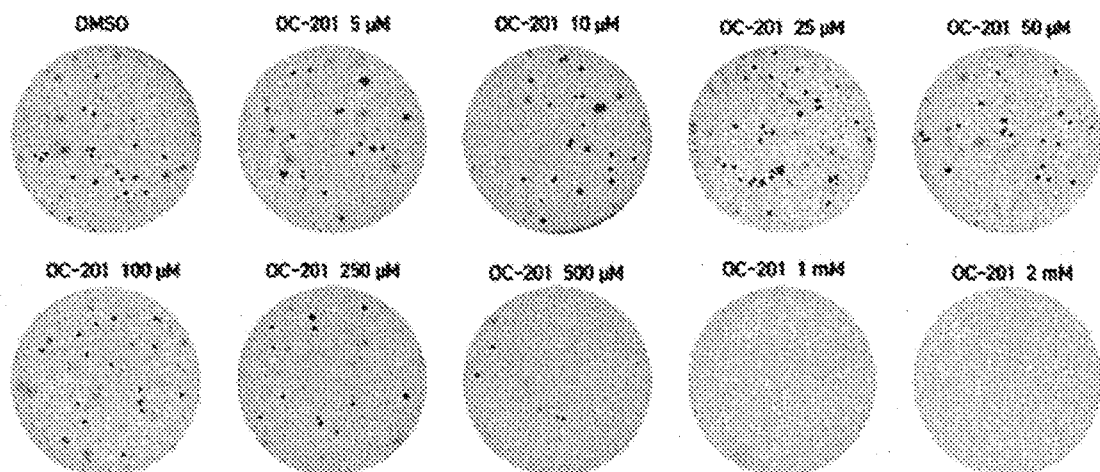


|     | DMSO | OC-201 5 µM |              |              |              |              |             |             |              |              |              |              |
|-----|------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|     |      | OC-202 5 µM | OC-202 10 µM | OC-202 25 µM | OC-202 25 µM | OC-202 50 µM | OC-201 5 µM | OC-202 5 µM | OC-202 10 µM | OC-202 25 µM | OC-202 25 µM | OC-202 50 µM |
| 0h  | 100  | 100         | 100          | 100          | 100          | 100          | 100         | 100         | 100          | 100          | 100          | 100          |
| 8h  | 77.6 | 82.2        | 84.8         | 88.2         | 93.3         | 83.0         | 77.5        | 87.8        | 90.7         | 84.0         | 85.7         | 84.1         |
| 24h | 40.0 | 62.7        | 70.8         | 75.3         | 83.3         | 81.8         | 60.0        | 67.8        | 73.3         | 88.2         | 75.9         | 69.2         |

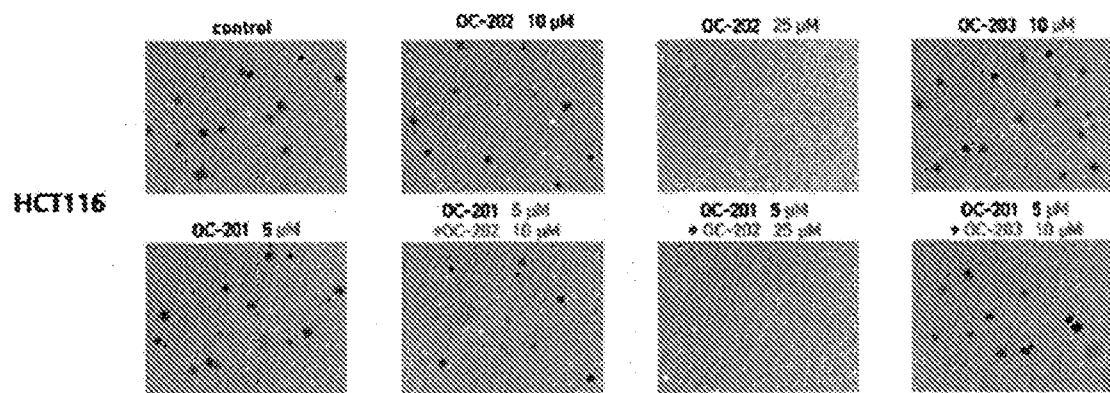
Tasa de migración = (área media ocupada por las células/área media original) x 100

[Figura 27]

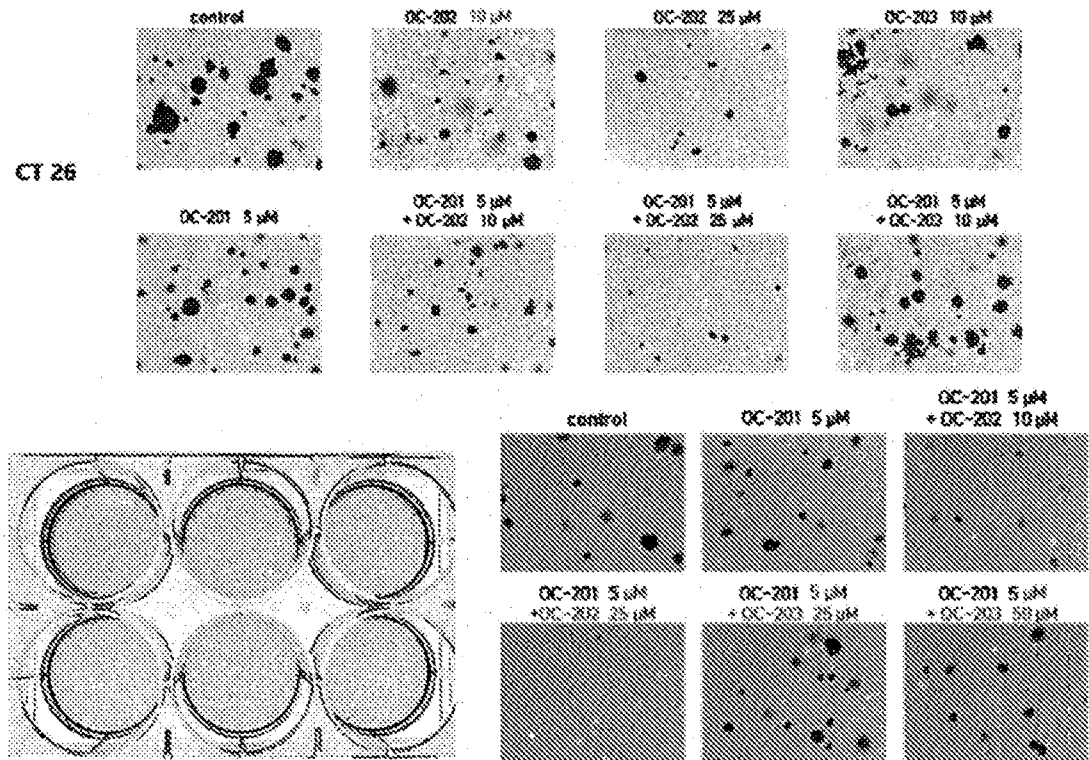
HCT116



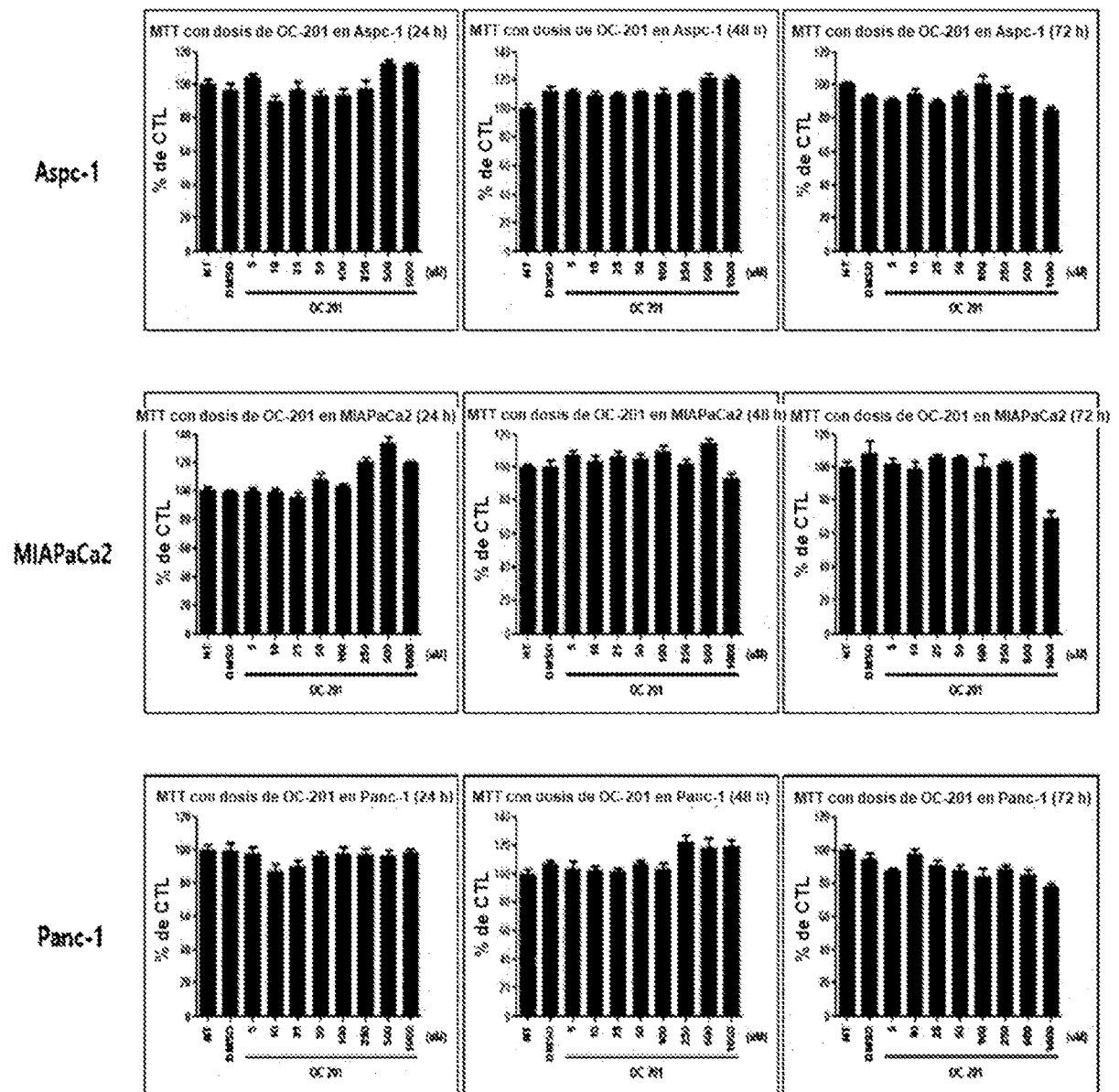
[Figura 28]



[Figura 29]

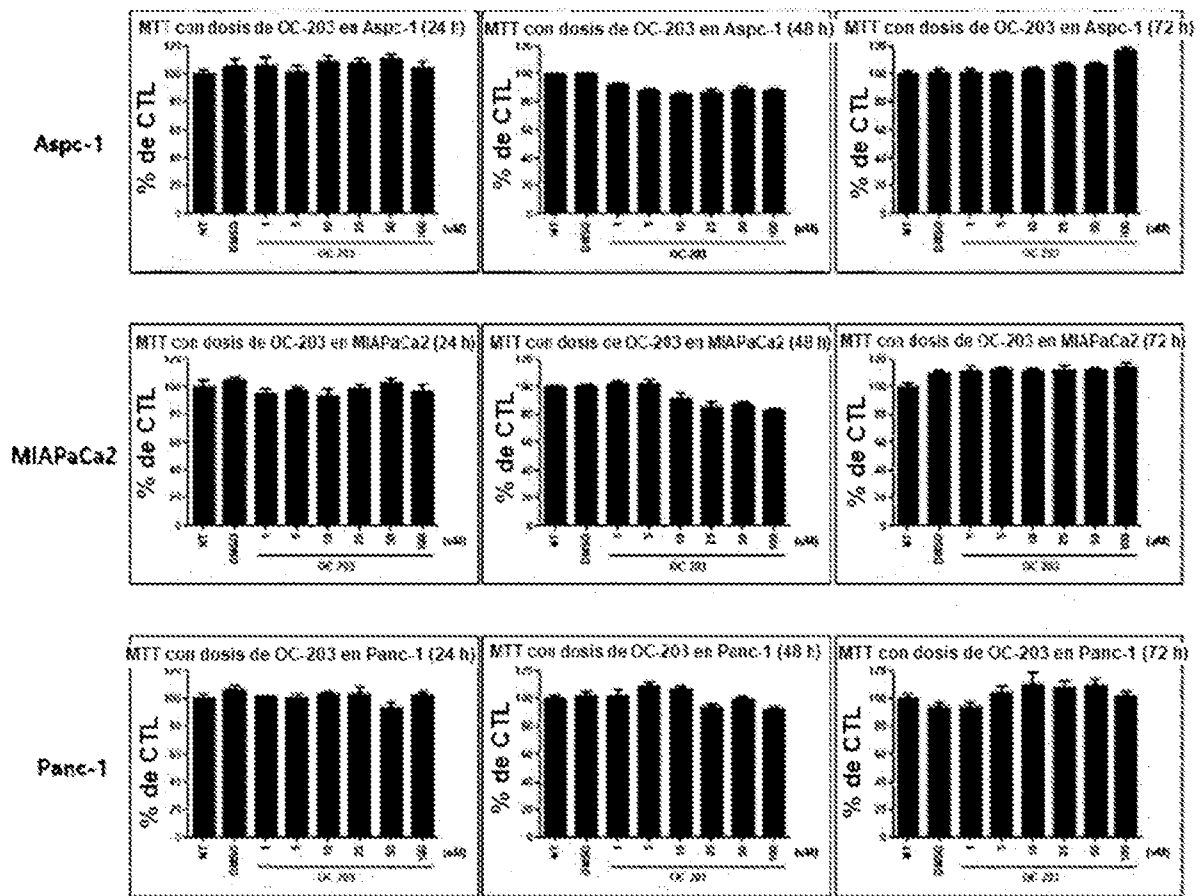


[Figura 30]



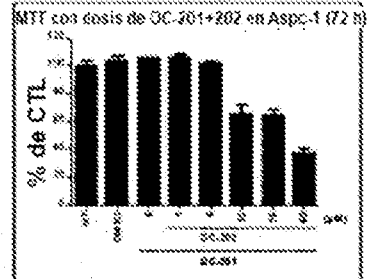
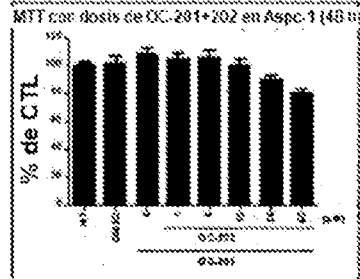
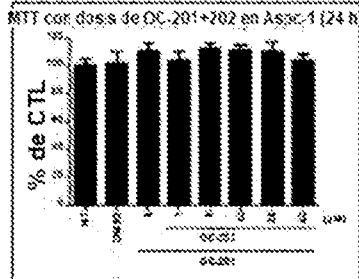


[Figura 32]

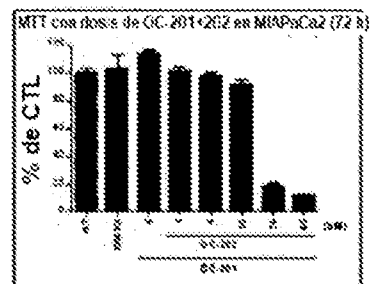
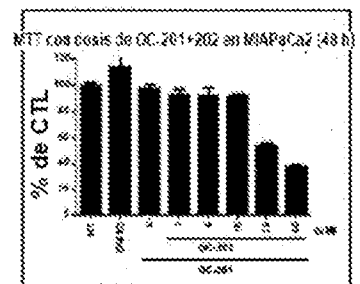
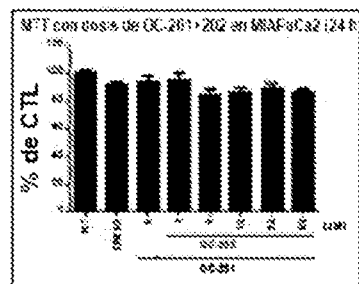


[Figura 33]

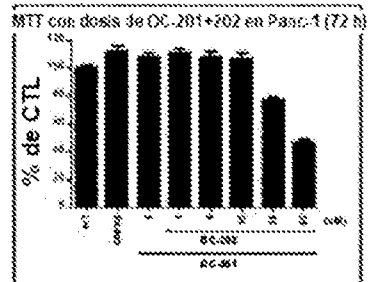
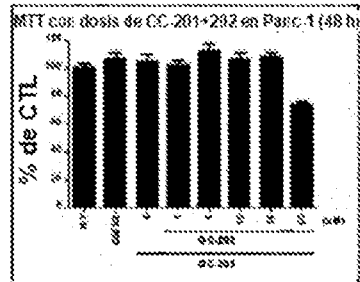
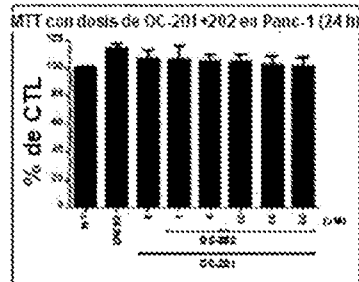
<Aspc-1>



<MIAPaCa2>



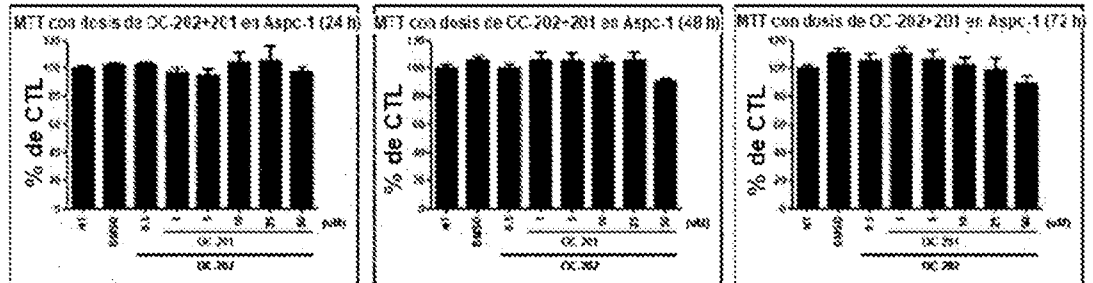
<Panc-1>



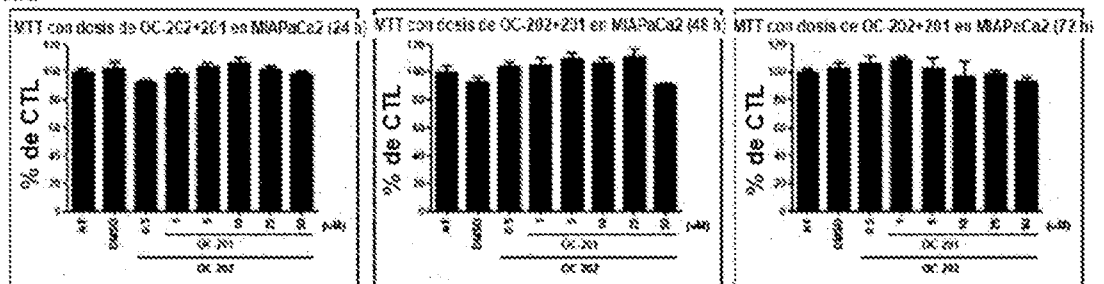


[Figura 34]

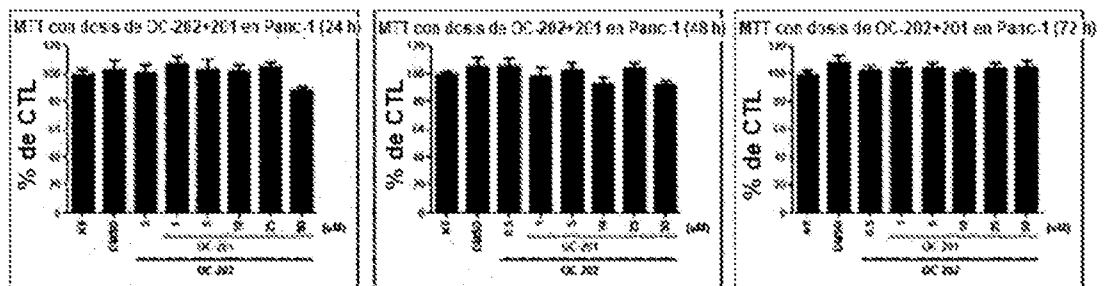
**Aspc-1**



**MIAPaCa2**

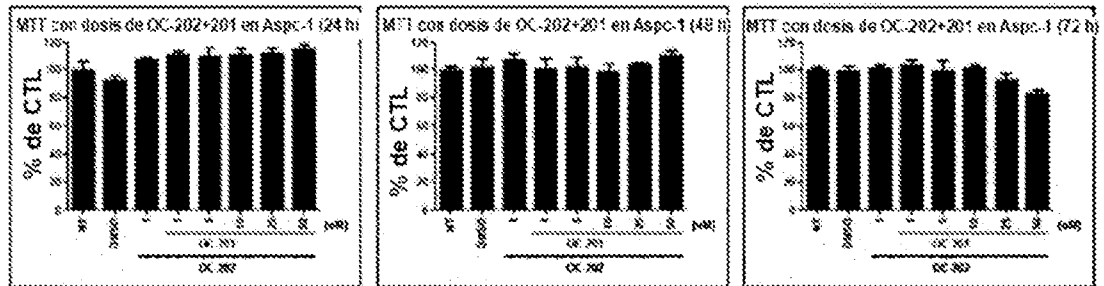


**Panc-1**

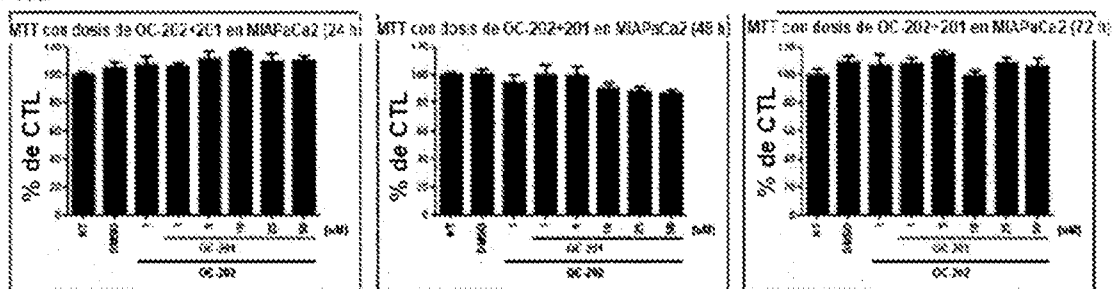


[Figura 35]

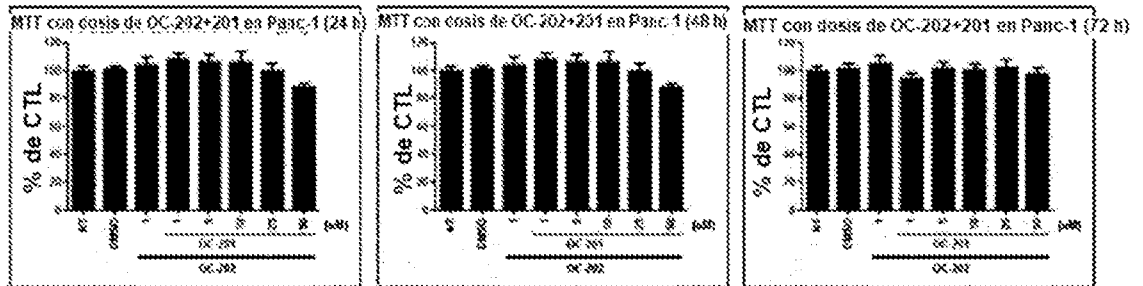
**Aspc-1**



**MIAPaCa2**

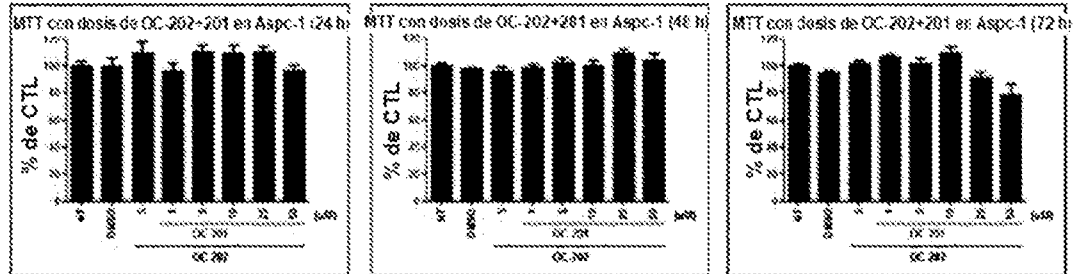


**Panc-1**

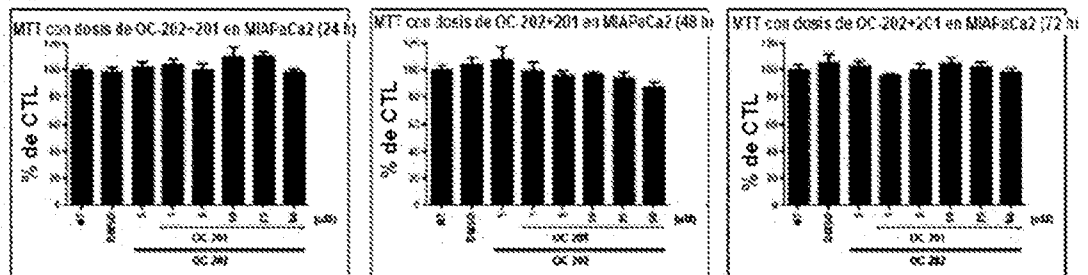


[Figura 36]

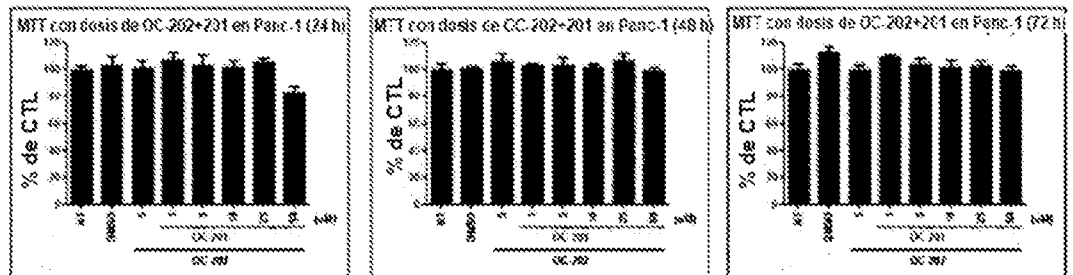
**Aspc-1**



**MIAPaCa2**

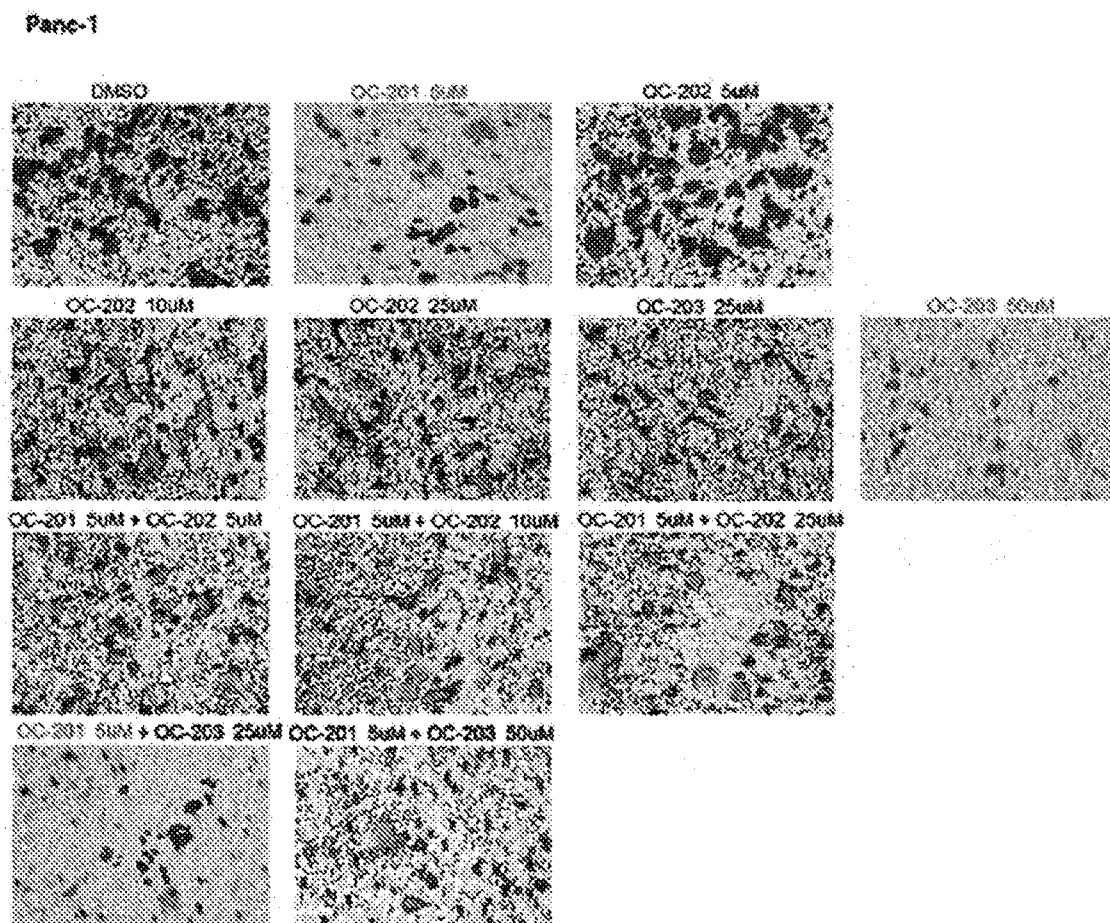


**Panc-1**

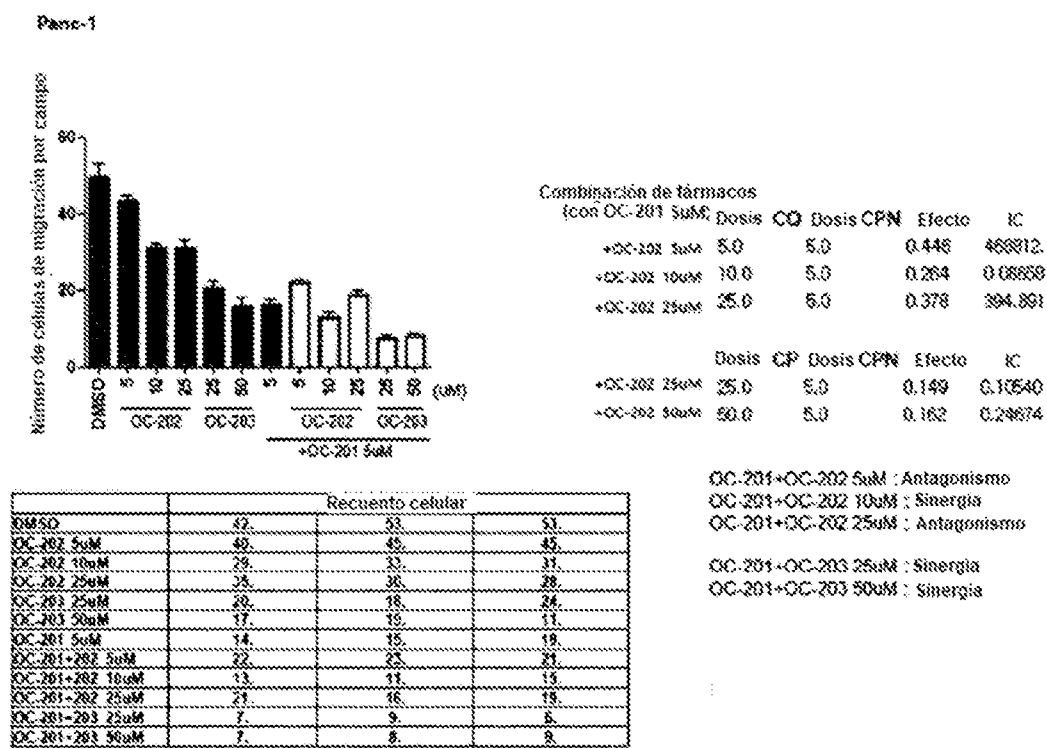




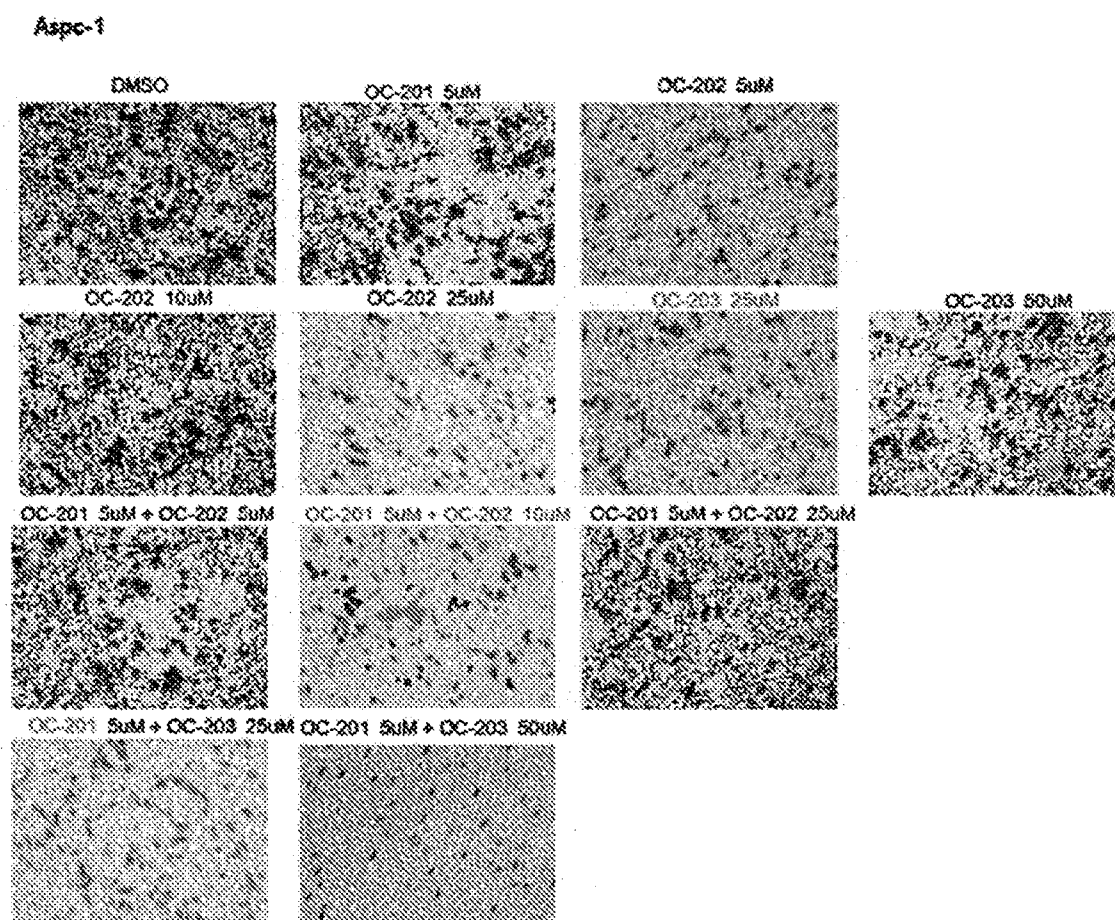
[Figura 38]



[Figura 39]



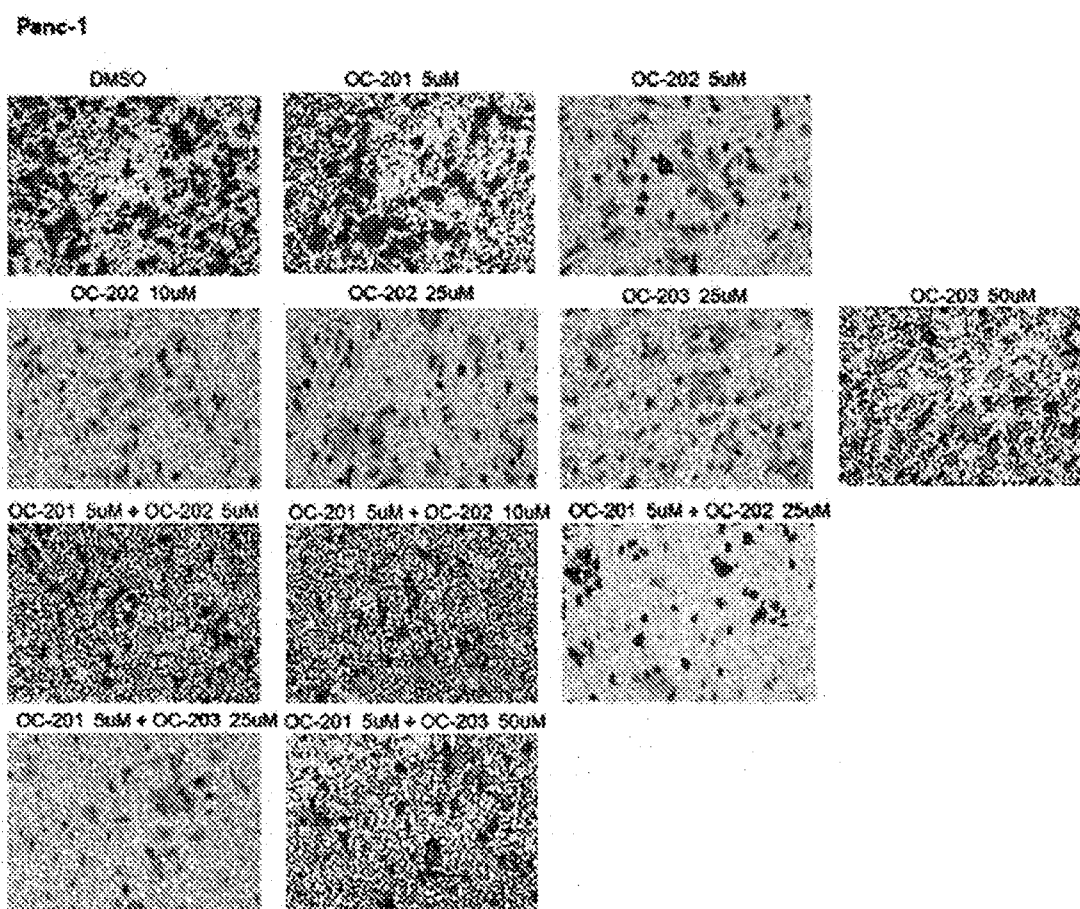
[Figura 40]





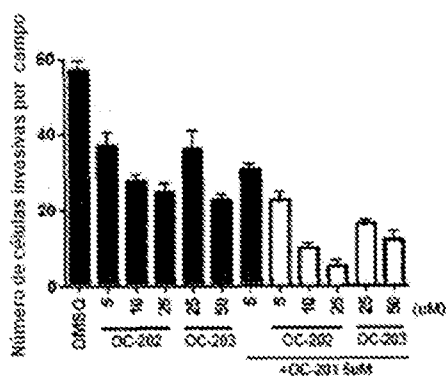


[Figura 42]



[Figura 43]

Panc-1



Combinación de fármacos

| (con OC-201 5uM) | Dosis CQ | Dosis CPN | Efecto | IC      |
|------------------|----------|-----------|--------|---------|
| +OC-202 5uM      | 5.0      | 5.0       | 0.395  | 0.17794 |
| +OC-202 10uM     | 10.0     | 5.0       | 0.174  | 0.04487 |
| +OC-202 25uM     | 25.0     | 5.0       | 0.003  | 0.03004 |

|              | Dosis CPN | Dosis CQ | Efecto | IC      |
|--------------|-----------|----------|--------|---------|
| +OC-202 25uM | 5.0       | 25.0     | 0.285  | 0.35216 |
| +OC-202 50uM | 5.0       | 50.0     | 0.215  | 0.53051 |

|                 | Recuento celular |    |    |
|-----------------|------------------|----|----|
| DMSO            | 61               | 53 | 58 |
| OC-202 5uM      | 44               | 33 | 35 |
| OC-202 10uM     | 28               | 31 | 25 |
| OC-202 25uM     | 25               | 29 | 29 |
| OC-203 25uM     | 45               | 39 | 35 |
| OC-203 50uM     | 25               | 26 | 23 |
| OC-201 5uM      | 29               | 36 | 34 |
| OC-201+202 5uM  | 21               | 20 | 27 |
| OC-201+202 10uM | 8                | 10 | 12 |
| OC-201+202 25uM | 8                | 3  | 5  |
| OC-201+203 25uM | 18               | 15 | 15 |
| OC-201+203 50uM | 16               | 10 | 11 |

OC-201+OC-202 5uM : Sinergia

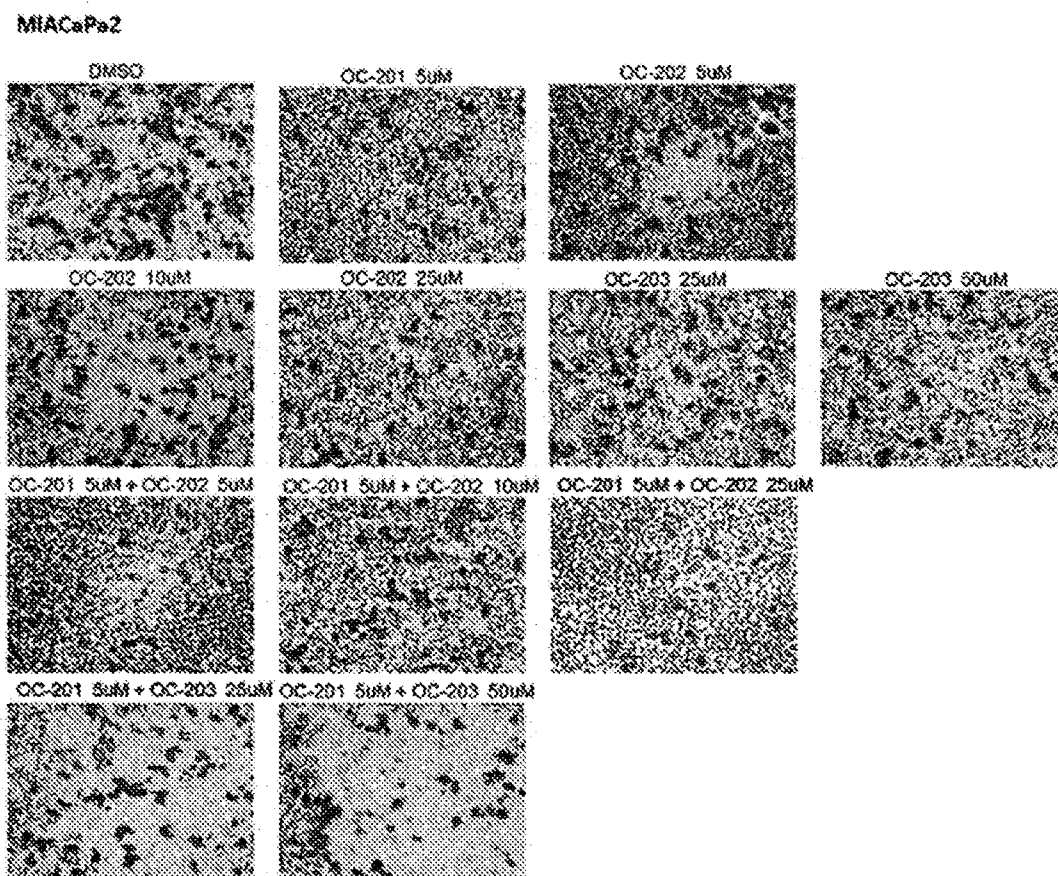
OC-201+OC-202 10uM : Sinergia

OC-201+OC-202 25uM : Sinergia

OC-201+OC-203 25uM : Sinergia

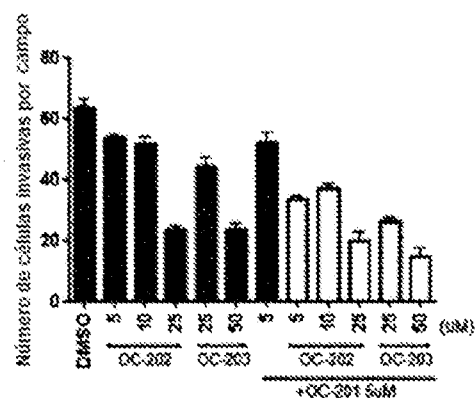
OC-201+OC-203 50uM : Sinergia

[Figura 44]



[Figura 45]

MIACaPa2

Combinación de fármacos  
(con OC-201 5μM)

| Dosis        | CPN | Dosis | CQ | Efecto | IC      |
|--------------|-----|-------|----|--------|---------|
| +OC-202 5μM  | 5.0 | 5.0   |    | 0.628  | 0.26840 |
| +OC-202 10μM | 5.0 | 10.0  |    | 0.584  | 0.69408 |
| +OC-202 25μM | 5.0 | 25.0  |    | 0.316  | 0.71799 |

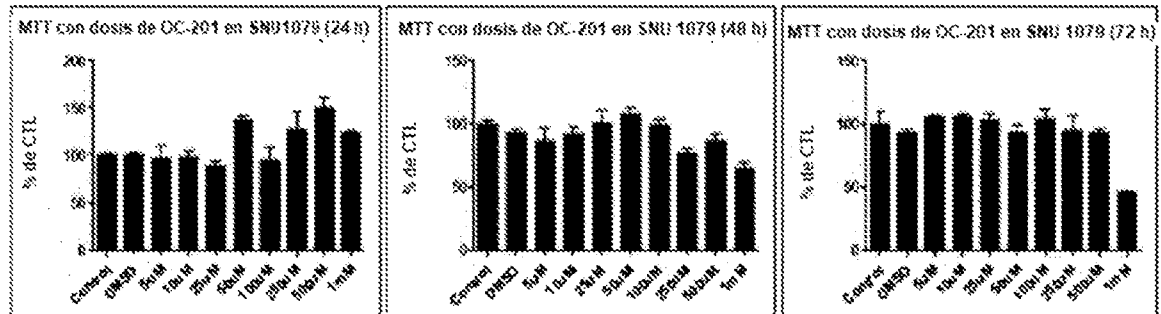
| Dosis        | CPN | Dosis | CP | Efecto | IC      |
|--------------|-----|-------|----|--------|---------|
| +OC-202 25μM | 5.0 | 25.0  |    | 0.416  | 0.54693 |
| +OC-202 50μM | 5.0 | 50.0  |    | 0.232  | 0.70683 |

|                 | Recuento celular |    |    |
|-----------------|------------------|----|----|
| DMSO            | 68               | 64 | 58 |
| OC-202 5μM      | 62               | 65 | 63 |
| OC-202 10μM     | 59               | 48 | 56 |
| OC-202 25μM     | 24               | 25 | 22 |
| OC-203 25μM     | 28               | 44 | 40 |
| OC-203 50μM     | 28               | 28 | 26 |
| OC-201 5μM      | 60               | 47 | 68 |
| OC-201+202 5μM  | 32               | 35 | 33 |
| OC-201+202 10μM | 38               | 29 | 34 |
| OC-201+202 25μM | 19               | 16 | 26 |
| OC-201+203 25μM | 27               | 28 | 24 |
| OC-201+203 50μM | 19               | 18 | 16 |

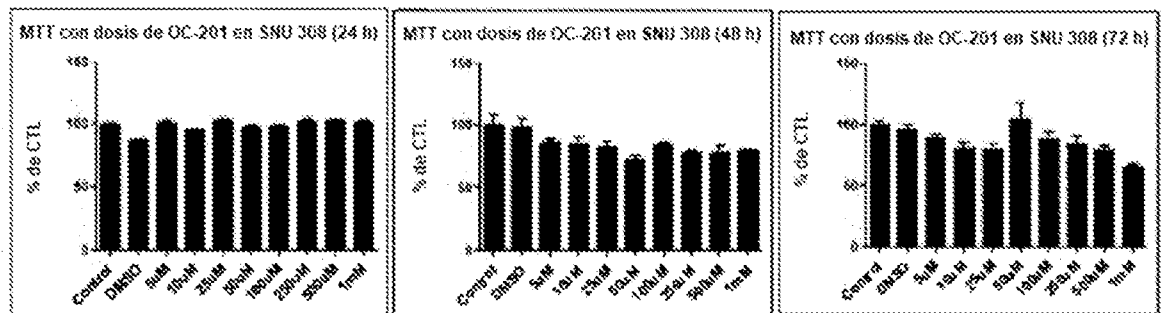
OC-201+OC-202 5μM : Sinergia  
 OC-201+OC-202 10μM : Sinergia  
 OC-201+OC-202 25μM : Sinergia  
 OC-201+OC-203 25μM : Sinergia  
 OC-201+OC-203 50μM : Sinergia

[Figura 46]

## SNU1879

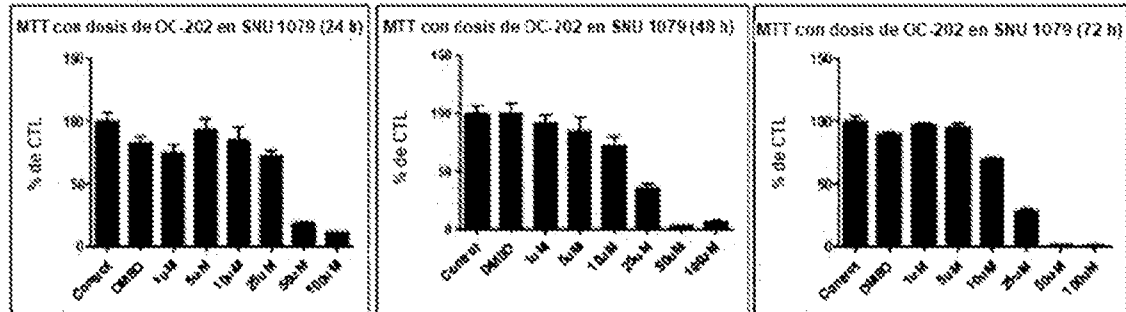


## SNU358

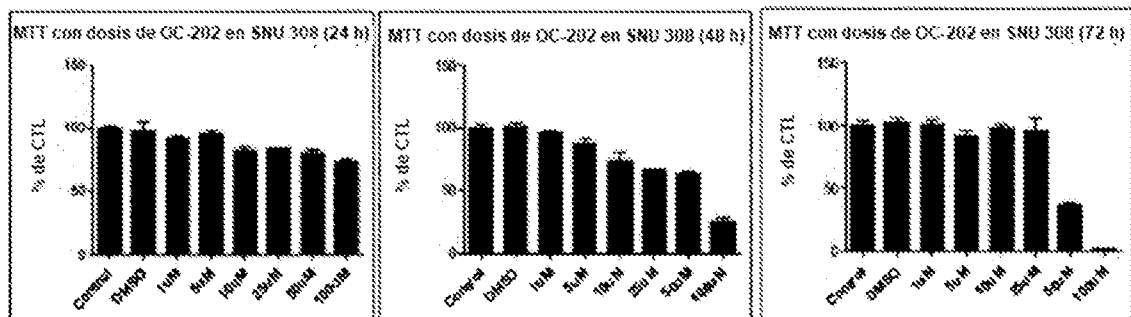


[Figura 47]

SNU1079

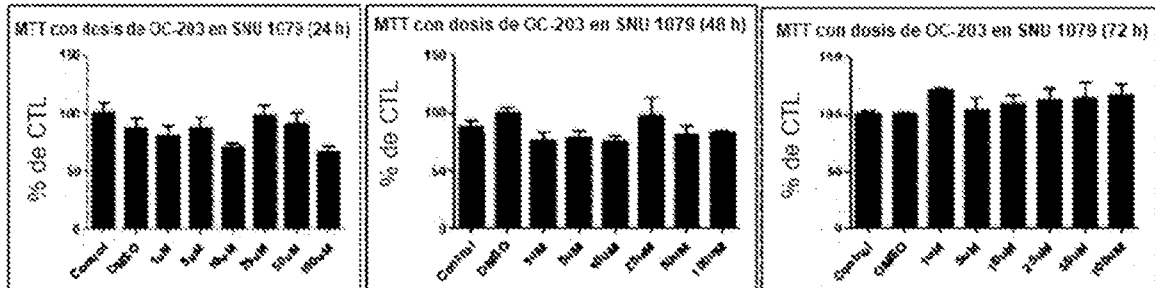


SNU308

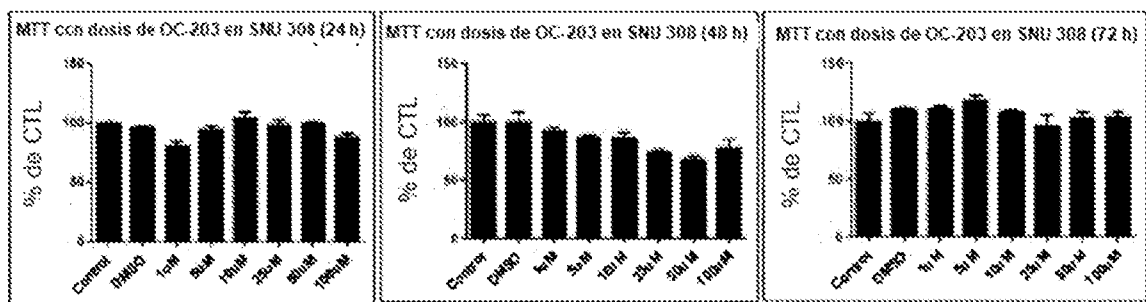


[Figura 48]

5801079

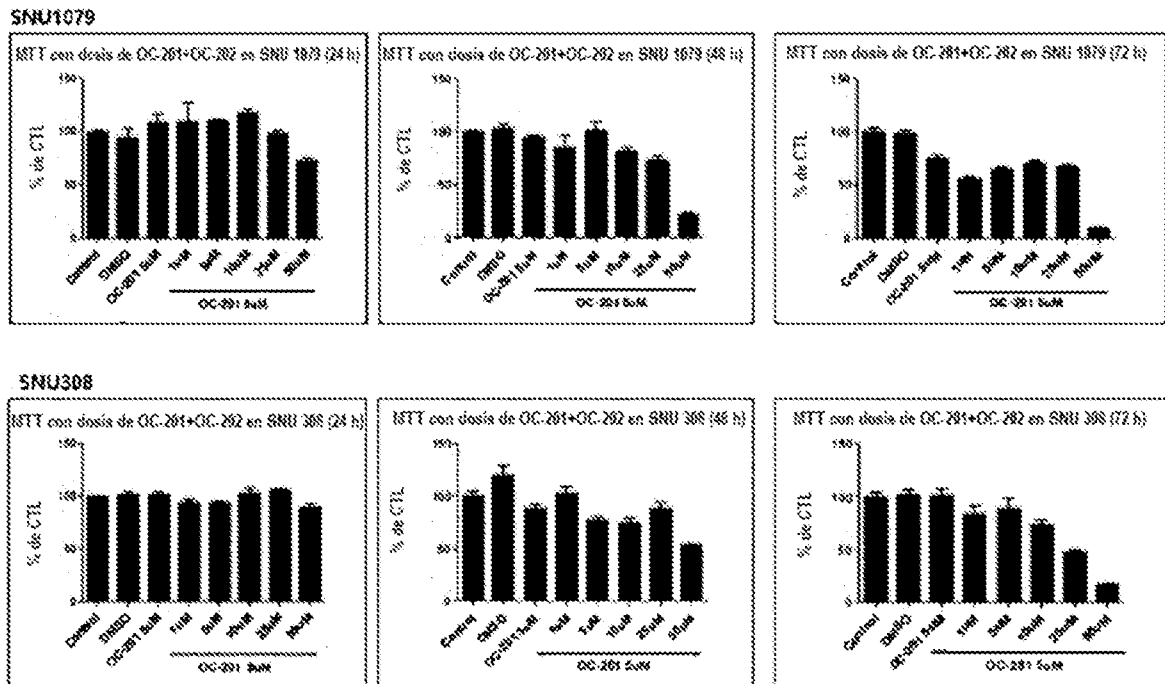


SNL308



71

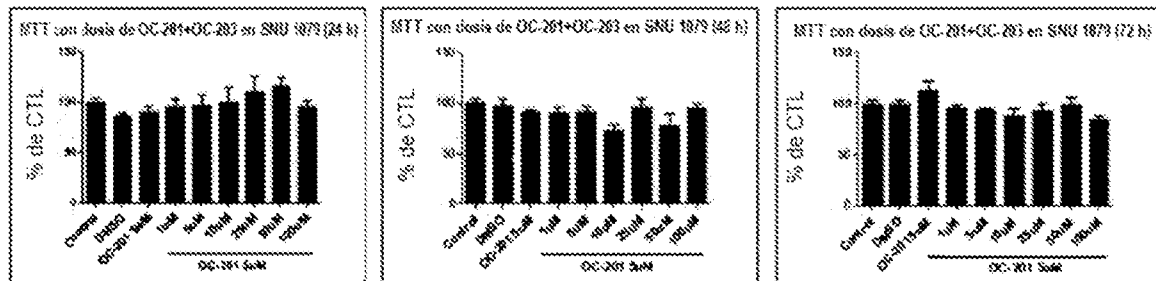
[Figura 49]



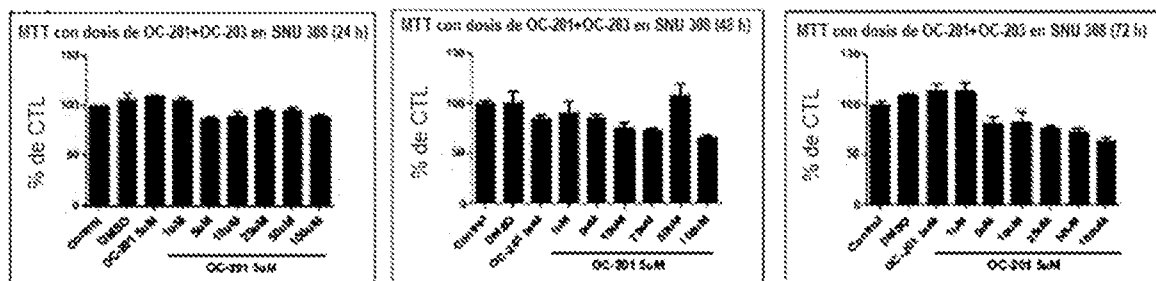


[Figura 50]

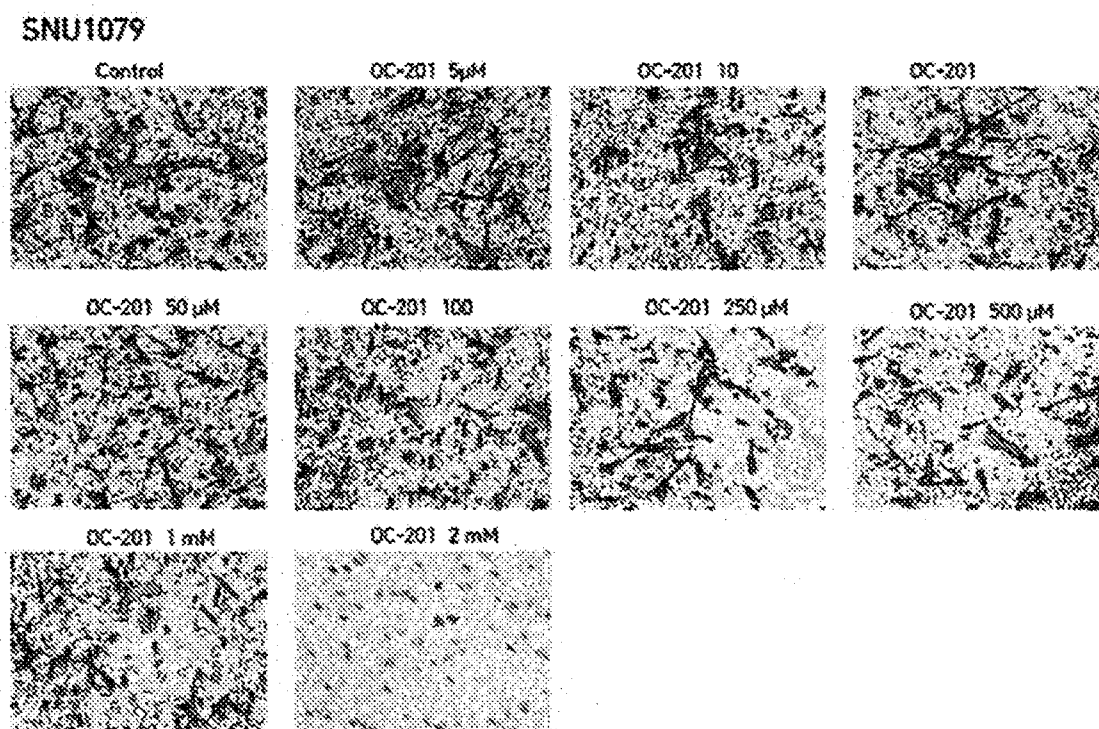
**SNU1079**



**SNU308**

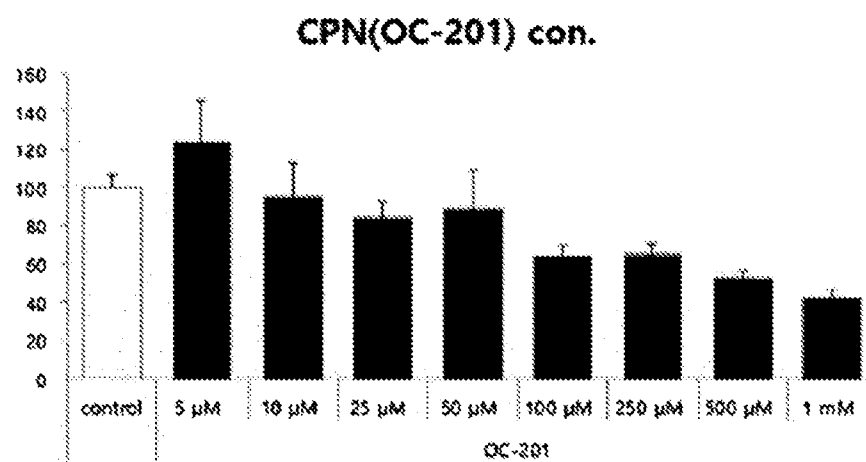


[Figura 51]



[Figura 52]

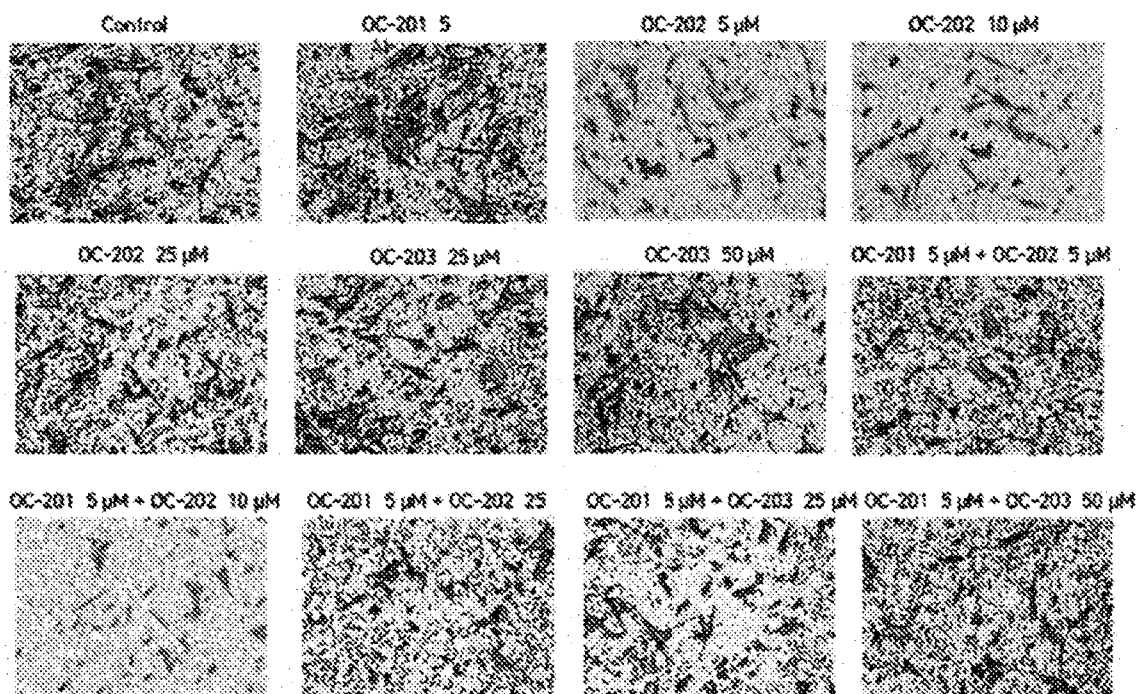
SNU1079



|         | OC-201 |       |       |       |        |        |        |      |
|---------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|------|
| control | 5 µM   | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 250 µM | 500 µM | 1 mM |
| 100     | 124.4  | 95.6  | 64.4  | 88.9  | 64.4   | 65.6   | 53.3   | 42.2 |

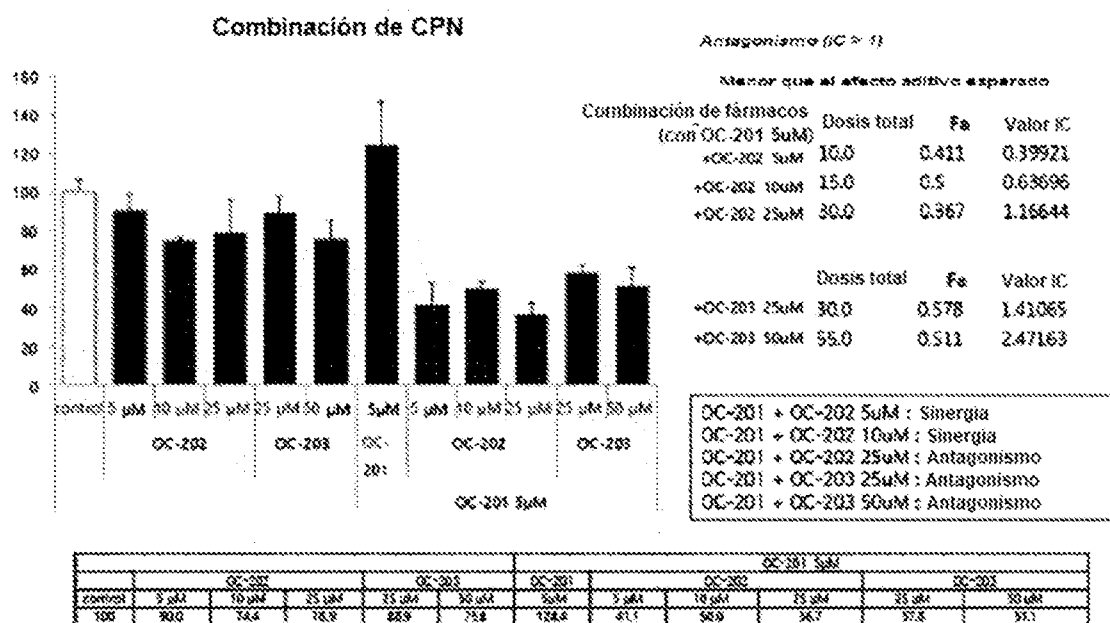
[Figura 53]

**SNU1079**



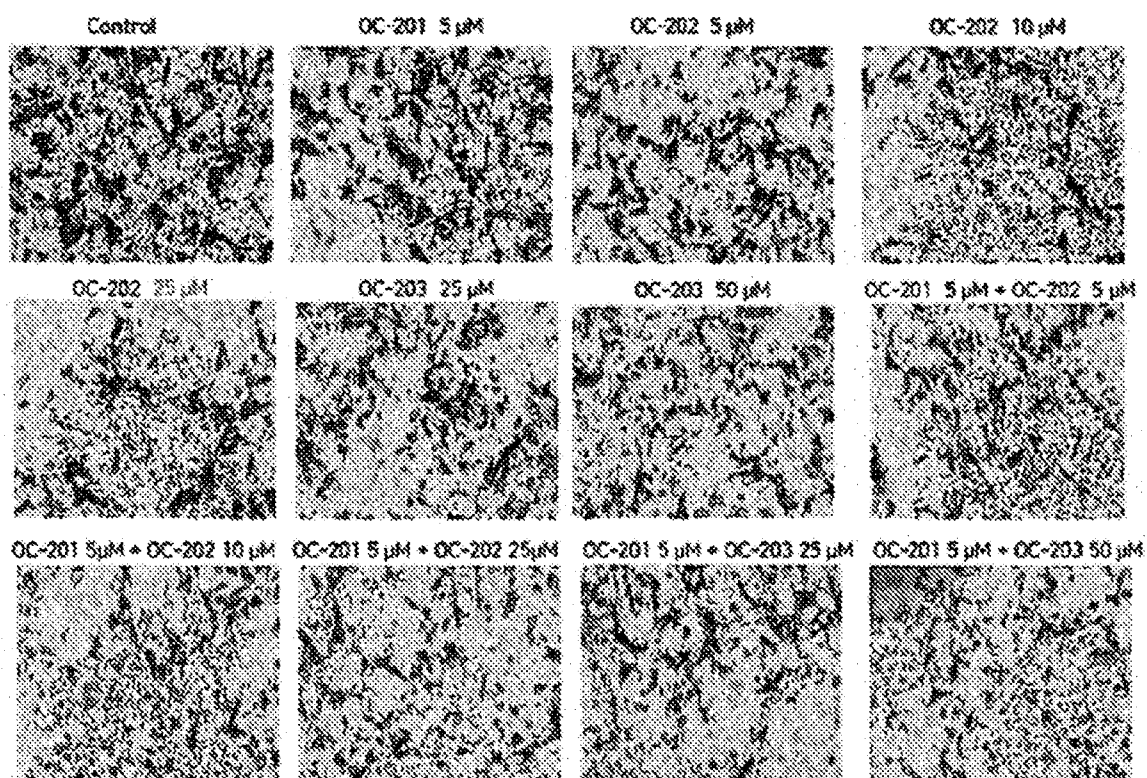
[Figura 54]

SNU1079



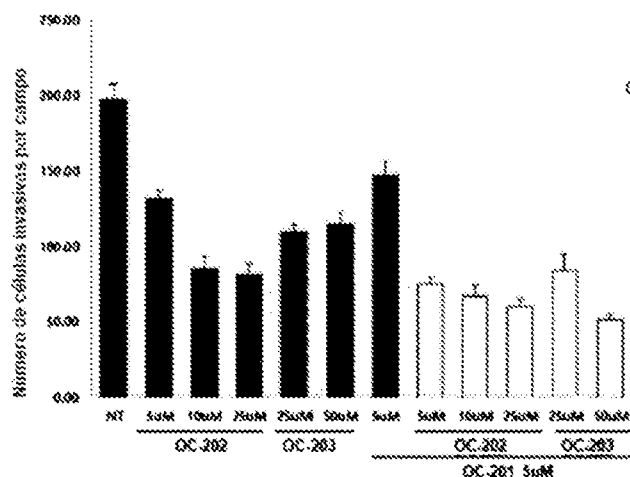
[Figura 55]

SNU1079



[Figura 56]

SNU1079



Sinergismo ( $IC < 1$ )

Mayor que el efecto aditivo esperado

Efecto aditivo ( $IC = 1$ )

El efecto combinado predicho por el principio de la ley de acción de masa en ausencia de sinergismo o antagonismo

Antagonismo ( $IC > 1$ )

Menor que el efecto aditivo esperado

| Comb. de fármacos<br>(con OC-201, 5uM) | Dosis total | Fa     | Valor IC |
|--|-------------|--------|----------|
| +OC-202 5uM                            | 10.0        | 0.3797 | 0.02900  |
| +OC-202 10uM                           | 15.0        | 0.3381 | 0.02112  |
| +OC-202 25uM                           | 30.0        | 0.3036 | 0.02269  |

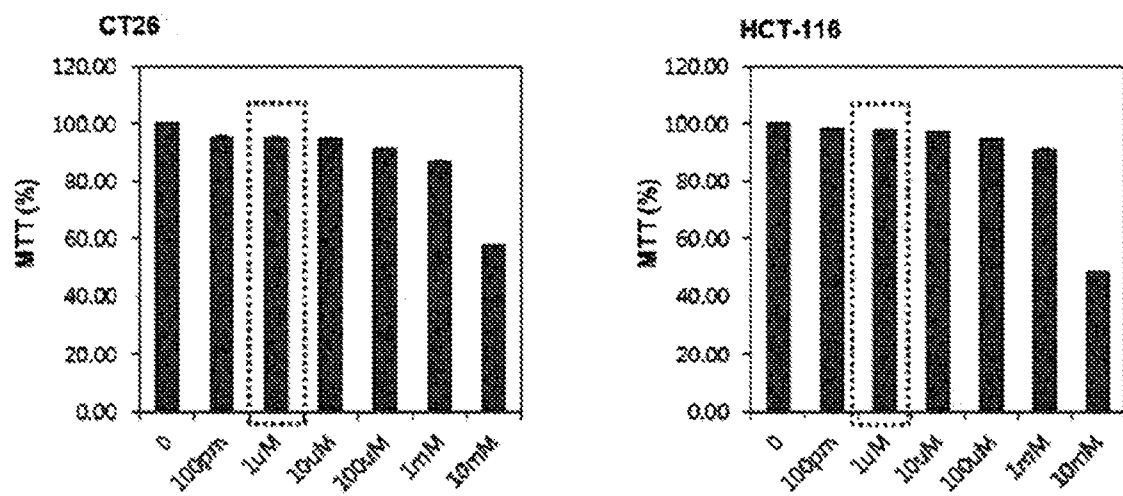
  

|              | Dosis total | Fa     | Valor IC |
|--------------|-------------|--------|----------|
| +OC-203 25uM | 30.0        | 0.4277 | 15.9846  |
| +OC-203 50uM | 55.0        | 0.2993 | 3924.43  |

OC-201 + OC-202 5uM : Sinergia  
 OC-201 + OC-202 10uM : Sinergia  
 OC-201 + OC-202 25uM : Sinergia  
 OC-201 + OC-203 25uM : Antagonismo  
 OC-201 + OC-203 50uM : Antagonismo

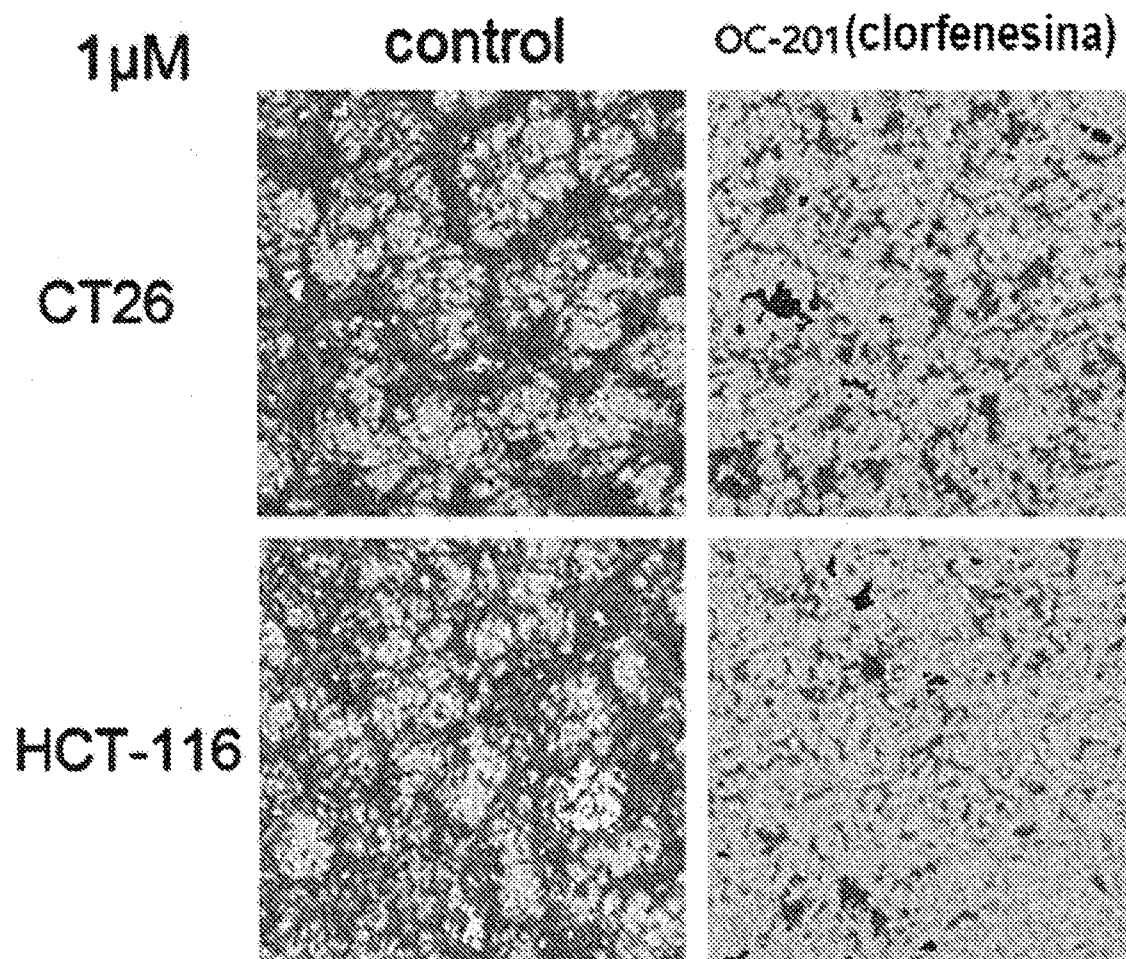
|          | NT     | OC-202<br>5uM | OC-202<br>10uM | OC-202<br>25uM | OC-202<br>50uM | OC-203<br>5uM | OC-201<br>5uM | OC-201 5uM +<br>OC-202 5uM | OC-201 5uM +<br>OC-202 10uM | OC-201 5uM +<br>OC-202 25uM | OC-201 5uM +<br>OC-203 25uM | OC-201 5uM +<br>OC-203 50uM |
|----------|--------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Promedio | 197.20 | 121.40        | 96.00          | 81.80          | 118.00         | 115.20        | 147.09        | 74.60                      | 66.67                       | 59.88                       | 64.73                       | 91.13                       |
| STDEV    | 9.68   | 11.15         | 12.86          | 14.64          | 9.17           | 11.41         | 18.17         | 10.90                      | 15.28                       | 9.96                        | 22.92                       | 8.88                        |

[Figura 57]



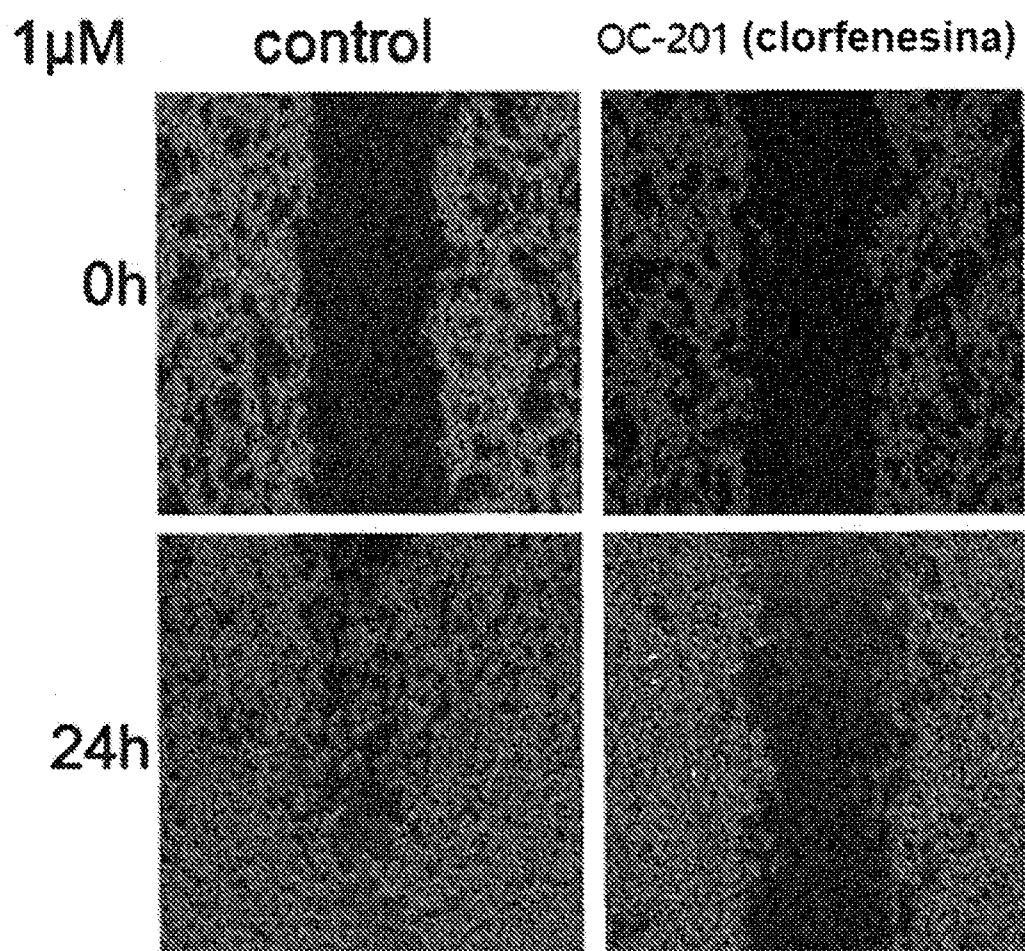


[Figura 58]

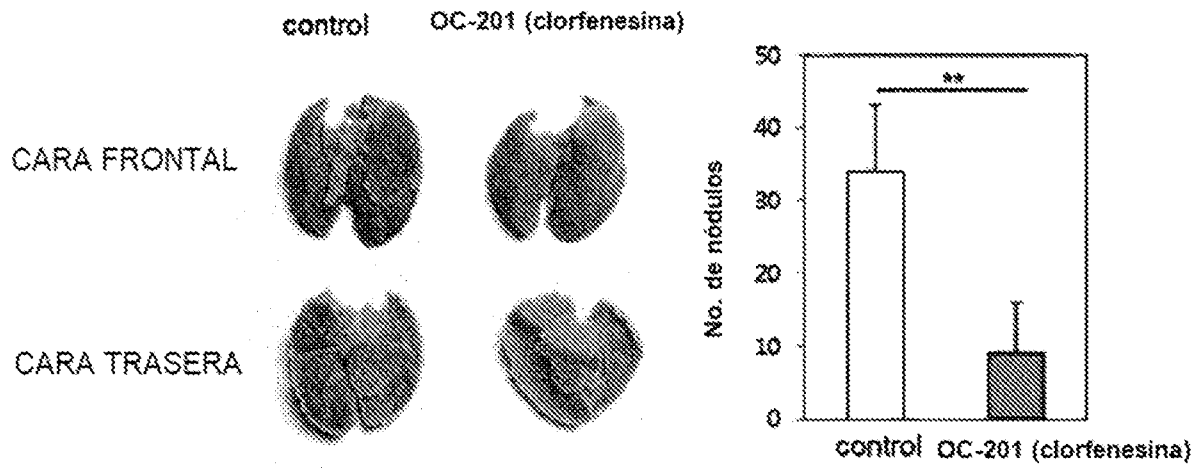


[Figura 59]

CT26



[Figura 60]



[Figura 61]

