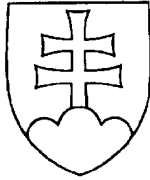


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **31. 1. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **10/041 427**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 1. 2002**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **1. 12. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP02/01005**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO03/057211**

(11), (21) Číslo dokumentu:

277-2004

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

**A61K 31/353,
A61K 31/375,
A61K 31/195,
A61K 31/401,
A61P 35/00**

(71) Prihlasovateľ: **Rath Matthias, Dr., Almelo, NL;**

(72) Pôvodca: **Rath Matthias, Dr., Almelo, NL;
Netke Shrirang, San Bruno, CA, US;
Ivanov Vadim, Castro Valley, CA, US;
Roomi M. Waheed, Sunnyvale, CA, US;
Niedzwiecki Aleksandra, San Jose, CA, US;**

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Kompozícia inhibujúca matrixové metaloproteinázy na liečenie neoplastických ochorení**

(57) Anotácia:
Kompozícia obsahuje katechínovú zlúčeninu, kyselinu askorbovú, prolín a lyzín. Použitie kompozície obsahujúcej katechínovú zlúčeninu, kyselinu askorbovú, prolín a lyzín na liečenie neoplastických ochorení.

SK 277-2004 A3

Kompozícia inhibujúca matrix-metaloproteinázy na liečenie neoplastických ochorení

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka použitia katechínových zlúčenín v kombinácii s ďalšími potravinovými zložkami pri inhibícii matrix-metaloproteináz. Predložený vynález sa predovšetkým týka použitia kompozície obsahujúcej katechín, kyselinu askorbovú, lyzín a prolín, na liečenie neoplastických ochorení.

Doterajší stav techniky

Polyfenolové zlúčeniny, známe tiež ako katechíny, sú prítomné v zelenom čaji a zistilo sa, že poskytujú ochranu proti rozmanitým chorobám, vrátane rakoviny (Mukhtar, H., Ahmed, N., Am. J. Clin. Nutr. 71, 1698S - 1702S (2000)). Sadzuka a kol. ukázali, že orálne podávanie zeleného čaju zvyšovalo tumor-inhibujúce účinky doxorubicínu u myší.

Protirakovinová aktivita katechínov môže súvisieť s ich účinkami na niektoré faktory zapojené do proliferácie rakovinových buniek a ich metastáz. Je známe, že katechíny spôsobujú zastavenie bunkového cyklu buniek karcinómu u človeka (Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A. L., Agarwal, R., Mukhtar, H. J., Natl. Cancer. Inst. 89, 1881 - 1886 (1997)). Ukázalo sa, že polyfenolová frakcia zo zeleného čaju chráni proti zápalu a cytokinéze vyvolanej nádormi.

Polyfenolové zlúčeniny predstavujú 30 % sušiny v zelenom čaji. Zahrnujú flavanoly, flavandioly, flavonoidy a fenolové kyseliny. Flavanoly sú spomedzi polyfenolov v zelenom čaji najhojnejšie a bežne sú známe ako katechíny. V zelenom čaji sa vyskytujú štyri hlavné katechíny: 1) (-)-epikatechín, 2) (-)-epikatechín-3-galát, 3) (-)-epigalokatechín a 4) (-)-epi-

galokatechín-3-galát (EGCG). Spomedzi katechínov je EGCG hlavnou polyfenovou zložkou v zelenom čaji.

EGCG je účinná antioxidantná zlúčenina (J. Cell. Biochem. 265, 236-257 (1996)) a môže sa jej prisúdiť protirakovinová aktivita zeleného čaju. Uvádza sa, že antimetastatická aktivita katechínových zlúčenín sa uplatňuje zamedzením procesu angiogenézy (Cay, Y., Cao, R., Nature 398, 381 (1999)). Tiež sa ukázalo, že EGCG interferuje s aktivitou urokinázy (uplasmínogénový aktivátor), jedným z najčastejšie exprimovaných enzýmov pri karcinómoch u človeka (Jankun, J., Selman, S. H., Swiercz, R., Skrzypczak, J. E. Nature 387-567 (1997)).

Avšak potvrdilo sa, že biologická dostupnosť polyfenolov je u človeka extrémne nízka (Chen, L., Lee, M.J., Yang, C.S. Drug Metab. Dispos. 25, 1045 - 1050 (1997); Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D.A., Kuo, M. C., Schantz S., Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 7, 351-35 (1998); Bell, J. R., Donovan, J.L., Wong, R., Waterhouse, H., German, J. B., Walzem, R.L., Kasim, K., Am. J. Clin. Nutr. 71, 103-108 (2000); Sherry Chow, H.H., Cai, Y., Alberts, D.S., Hakim, I., Dorr, R., Shahi, F., Crowell, J.A., Yang, S.C., Hara, H., Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 10, 53-58 (2001)). Uvedené literárne odkazy sú tu týmto začlenené v celom rozsahu. Nízka koncentrácia v tkanivách značne znižuje terapeutickú hodnotu polyfenolov, vrátane EGCG. Pretrváva potreba nájsť lepšiu kompozíciu obsahujúcu polyfenoly, ktorá by bola účinná pri liečbe neoplastických ochorení. Prekvapujúco bola nájdená kompozícia obsahujúca katechíny, kyselinu askorbovú, prolín a lyzín, ktorá môže uplatňovať účinnú anti-proliferáciu a anti-metastatickú aktivitu proti neoplastickým ochoreniam.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka kompozície biochemických látok obsahujúcej katechín, antioxidant, prolín a lyzín,

ktoré sú účinné pri liečení humánných ochorení.

Predložený vynález sa týka kompozície biochemických látok obsahujúcej katechín, antioxidant, prolín a lyzín, ktoré sú účinné pri inhibícii matrix-metaloproteinázy.

Predložený vynález sa týka spôsobu liečenia neoplastických ochorení súvisiacich s nadmernou degradáciou extracelulárneho matrixu, pričom toto liečenie zahŕňa podávanie účinného množstva kompozície obsahujúcej katechínovú zlúčeninu, antioxidant, prolín a lyzín.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 zobrazuje inhibičné účinky EGCG na bunkovú proliferáciu rakovinových buniek prsníka (MDA-MB 231).

Obrázok 2 zobrazuje synergické inhibičné účinky kombinácie EGCG, kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu na bunkovú proliferáciu rakovinových buniek prsníka (MDA-MB 231).

Obrázok 3 zobrazuje synergické inhibičné účinky kombinácie EGCG, kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu na bunkovú proliferáciu rakovinových buniek hrubého čreva (HCT 116).

Obrázok 4 zobrazuje, že EGCG (20 µg/ml) inhibuje Matrigelovú inváziu rakovinovými bunkami prsníka o približne 25 %. Kombinácia kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu inhibuje približne 65 %. Kombinácia kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s EGCG (20 µg/ml) úplne inhibuje (približne 100 %) Matrigelovú inváziu.

Obrázok 5 zobrazuje kombináciu kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s EGCG (20 µg/ml), ktorá synergicky inhibuje na 100 % Matrigelovú inváziu bunkami melanómu (A 2058).

Obrázok 6 zobrazuje zymogram znázorňujúci zníženie aktivity MMP2 vylučovanej rakovinovými bunkami prsníka vplyvom EGCG.

Obrázok 7 zobrazuje normálnu morfológiu buniek melanómu po skúške Matrigelovej invázie.

Obrázok 8 zobrazuje zmeny vyvolané kombináciou kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu v morfológii buniek melanómu.

Obrázok 9 zobrazuje apoptotické účinky kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s EGCG.

V ďalšom uskutočnení sa predložený vynález týka kompozície obsahujúcej katechíny prítomné v čajových extraktoch, červenom víne v kombinácii s ďalšími potravinovými zložkami, pokiaľ ide o synergické účinky, proti neoplastickým ochoreniam a celému radu ďalších chorôb. Potravinové zložky obsiahnuté v tejto prihláške zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na tie, ktoré sú podrobne opísané v tejto prihláške.

Katechínové zlúčeniny sa môžu použiť v kombinácii s ďalšími antioxidantmi, ako je vitamín E, glutatión, s ďalšími flavinoidmi, s facilitačnými činidlami, ako je kyselina listová, a s kovmi, ako je selén, o ktorých je známe, že vhodne modifikujú aktivitu matrix-metaloproteináz, čo poskytuje možnosť znížiť účinnú koncentráciu, pri ktorej EGCG môže manifestovať svoju protinádorovú aktivitu.

V ďalšom uskutočnení sa predložený vynález týka kompozície obsahujúcej katechíny, ktoré sú účinné pri redukcii transformácie normálneho tela buniek na rakovinové bunky.

V ďalšom uskutočnení sa predložený vynález týka kompozície obsahujúcej katechíny, ktoré sú účinné pri prevencii bunkovej proliferácie rakovinových buniek a pri redukcii syntézy, sekrécie a/alebo aktivity rozmanitých

matrix-metaloproteináz, ktoré trávia extra-celulárny matrix (ECM).

Ešte v ďalšom uskutočnení sa predložený vynález týka spôsobu prevencie a úpravy neplastických podmienok podávaním takejto kompozície obsahujúcej katechíny, kyselinu askorbovú, prolín a lyzín, orálne alebo topickou aplikáciou.

Predložený vynález je v ďalšom opísaný podrobnejšie s odkazmi na nasledujúce príklady uskutočnenia, ktoré však v žiadnom prípade neznamenajú obmedzenie rozsahu vynálezu.

Všeobecné experimentálne podmienky

(a) Línie buniek

V štúdiách sa použili nasledujúce línie rakovinových buniek, ktoré sa získali z ATCC:

- (i) Ludské rakovinové bunky prsníka MDA-MB 231
- (ii) Ludské rakovinové bunky hrubého čreva HCT 116
- (iii) Ludské melanómové bunky A 2058

(b) Štúdie proliferácie buniek

Na skúmanie účinkov katechínov a diétnej kompozície na bunkovú proliferáciu ľudských rakovinových buniek sa rozličné línie ľudských rakovinových buniek kultivovali v 24-jamkových platničkách pri kultivačných podmienkach, ktoré stanovil ATCC (dodávateľ bunkových línií). Bunky sa všeobecne inkubovali počas 3 až 4 dní (pred dosiahnutím koalescencie). Celkový počet buniek v kultivačnej jamke sa stanovil farbením buniek s vitálnym farbivom (MTT) a následným stanovením OD vo farebnom roztoku. MTT farbí len mŕtve bunky a množstvo absorpcie farbiva súvisí s počtom mŕtvych buniek v kultúre. Percento inhibície sa vypočítalo porovnaním OD ošetrených skupín s OD kontrolných skupín.

(c) Štúdie Matrigelovej invázie

Štúdie Matrigelovej invázie sa uskutočnili s použitím vložiek Matrigelu (Becton Dickinson) v kompatibilných 24-jamkových platničkách. Táto skúška je osvedčenou skúškou na vyhodnotenie metastáz rakoviny.

Ludské fibroblastové bunky sa naočkovali a nechali sa rásť v 24-jamkových platničkách s použitím kultivačného média obsahujúceho približne 10 % séra. Keď fibroblasty dosiahli koalescenciu kultivačné médium so sérom sa odstránilo a nahradilo sa čerstvým médiom bez séra. K médiu bez séra sa pridala kombinácia katechínových zlúčenín spolu s diétnou kompozíciou a ľudské rakovinové bunky sa naočkovali na horný povrch Matrigelových vložiek.

Po 18 hodinách sa médiá odstránili. Niektoré médiá sa odložili na zymogramové štúdie. Bunky na hornom povrchu vložiek sa mierne zotrelí s použitím vatového tampónu. Bunky, ktoré penetrovali cez Matrigelovú membránu a migrovali do spodného povrchu Matrigelu sa farbili farbivom Quick Stain a spočítali sa pod mikroskopom.

(d) Zymogramové štúdie

Médiá (25 až 30 μ l) zo štúdií Matrigelovej invázie sa aplikovali na Novexové zymogramové gély (Invitrogen). Gélové platne sa vyvíjali a farbili podľa odporúčania výrobcu. Pásky matrix-metaloproteináz (MMP) sa identifikovali na základe ich známych molekulových hmotností.

(e) Morfologické štúdie

Morfológia ľudských rakovinových buniek, ktoré migrovali do spodného povrchu Matrigelovej membrány sa farbili farbivom Quick Stain a fotografovali sa pod mikroskopom (100X).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Inhibičné účinky epigalokatechíngalátu (EGCG) na bunkovú proliferáciu ľudských rakovinových buniek prsníka (MDA MB 231)

V týchto štúdiách sa 5×10^4 rakovinových buniek prsníka (MDA MB 231) naočkovovalo do každej jamky 24-jamkovej platne. Kontrolnou skupinou boli rakovinové bunky prsníka, ktoré sa nechali rásť v Liebovitzovom médiu doplnenom s 10 % fetálneho hovädzieho séra (fetal bovine serum, FBS). Ošetrovanou skupinou boli rakovinové bunky prsníka, ktoré sa nechali rásť v Liebovitzovom médiu doplnenom s 10 % fetálneho hovädzieho séra (FBS) plus buď 0, 10, 20, 50, 100 alebo 200 $\mu\text{g/ml}$ EGCG. Platne sa inkubovali v okolitom ovzduší (bez doplnku CO_2) počas 4 dní.

Na konci tejto doby sa kultivačné médiá odstránili a bunky v každej jamke sa farbili s MTT. Nadbytok MTT sa vymyl. Vyfarbené MTT rakovinové bunky sa rozpustili v 1 ml roztoku DMSO. Pre každú jamku sa stanovila optická hustota (optical density, OD) roztoku. Hodnota optickej hustoty pre jamku bola priamo úmerná počtu mŕtvych buniek. Hodnota optickej hustoty s MTT vyfarbených rakovinových buniek, ktoré sa predtým kultivovali bez prítomnosti EGCG sa použila ako referenčná vzorka a považovala sa za rovnú 100. Percento inhibície sa vypočítalo s použitím vzorca: % Inhibície = $(\text{OD referenčnej vzorky} - \text{OD testovanej úpravy}) / \text{OD referenčnej vzorky} \times 100 \%$.

EGCG v množstve 20 $\mu\text{g/ml}$ poskytovalo inhibíciu 3 %, v množstve 50 $\mu\text{g/ml}$ poskytovalo inhibíciu 34 %, v množstve 100 $\mu\text{g/ml}$ poskytovalo inhibíciu 66 % a v množstve 200 $\mu\text{g/ml}$ poskytovalo 70 % inhibíciu bunkovej proliferácie ľudských

rakovinových buniek (obrázok 1). EGCG v množstve 10 µg/ml neposkytoval inhibíciu bunkovej proliferácie.

Príklad 2

Inhibičný účinok kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s rozličnými koncentráciami EGCG na bunkovú proliferáciu ľudských rakovinových buniek prsníka (MDA MB 231)

Všeobecný postup pri týchto štúdiách bol rovnaký ako v príklade 1.

V týchto štúdiách sa bazálne kultivačné média doplnili nasledovne:

- i) kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM);
- ii) kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM) + lyzín (400 µM);
- iii) kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM) + lyzín (400 µM) plus 20 µg/ml EGCG;
- iv) kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM) + lyzín (400 µM) plus 50 µg/ml EGCG; alebo
- v) kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM) + lyzín (400 µM) plus 100 µg/ml EGCG.

Kyselina askorbová + prolín nespôsobili žiadnu inhibíciu bunkovej proliferácie. Kyselina askorbová + prolín + lyzín inhibovali bunkovú proliferáciu o približne 14 % (obrázok 2). Kombinácia kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu plus 20 µg/ml EGCG poskytovali 20 % inhibíciu bunkovej proliferácie (obrázok 2). Samotný EGCG v množstve 20 µg/ml poskytoval len 3 % inhibíciu bunkovej proliferácie (príklad

1). Kombinácia kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu pôsobí teda synergicky s EGCG pri inhibícii proliferácie rakovinových buniek.

Príklad 3

Inhibičné účinky kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s rozličnými hladinami EGCG na bunkovú proliferáciu ľudských rakovinových buniek hrubého čreva (HCT 116)

V tejto štúdií sa ľudské rakovinové bunky hrubého čreva nechali rásť na McCoyovom médiu s 10 % fetálneho hovädzieho séra (FBS) v atmosfére 5 % CO₂. Použil sa rovnaký všeobecný postup a spôsob skúmania ako v príklade 2.

Kombinácia kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s EGCG synergicky zvyšovala inhibičné účinky na bunkovú proliferáciu z 0 % na 31 % pri 20 µg/ml EGCG a na približne 95 % pri 50 µg/ml EGCG (obrázok 3).

Inhibičné účinky EGCG a kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu na inváziu Matrigelu rakovinovými bunkami

Príklad 4

Inhibičné účinky odstupňovaných hladín EGCG a kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s rozličnými hladinami EGCG na inváziu rakovinových buniek prsníka (MDA MB 231) cez Matrigel

Všeobecný postup pre Matrigelovú invazívnu skúšku bol opísaný vyššie. V tejto skúške sa na každú vložku naočkovali ľudské rakovinové bunky prsníka (5×10^4). K Liebovitzovmu médiu sa pridali rozličné doplnky. Platne sa inkubovali v inkubátore v okolitom ovzduší bez doplnku CO₂.

Kompozícia obsahujúca 20 µg/ml EGCG v médiu inhibovala inváziu rakovinovými bunkami prsníka o približne 26 % a

kompozícia obsahujúca 50 µg/ml EGCG v médiu inhibovala inváziu rakovinovými bunkami prsníka o približne 100 %. Zatiaľ čo kyselina askorbová (100 µM) + prolín (140 µM) + lyzín (400 µM) v médiách poskytovala 65 % inhibíciu, kombinácia kyseliny askorbovej (100 µM) + prolínu (140 µM) + lyzínu (400 µM) plus 20 µg/ml EGCG úplne inhibovala (100 % inhibícia) inváziu rakovinovými bunkami (Obrázok 4).

Príklad 5

Inhibičné účinky odstupňovaných hladín EGCG a kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu s rozličnými hladinami EGCG na inváziu ľudských melanómových buniek (A 2058) cez Matrigel

Všeobecný postup pre Matrigelovú invazívnu skúšku bol opísaný vyššie. Ľudské melanómové bunky (A 2058) (5×10^4) sa naočkovali na každú vložku. K DMEM sa pridali rozličné doplnky. Platne sa inkubovali v inkubátore v atmosfére 5 % CO₂.

Zatiaľ čo kombinácia kyseliny askorbovej (100 µM) + prolínu (140 µM) + lyzínu (400 µM) poskytovala len 13 % inhibíciu, kombinácia kyseliny askorbovej (100 µM) + prolínu (140 µM) + lyzínu (400 µM) plus 20 µg/ml EGCG úplne zamedzovala invázii melanómových buniek cez Matrigel (Obrázok 5).

Zymogramové štúdie

Príklad 6

Účinky odstupňovaných hladín EGCG na produkciu MMP2 ľudskými rakovinovými bunkami prsníka (MSA MB 231)

Médiá z rozličných úprav v skúške Matrigelovej invázie (Príklad 4) sa aplikovali na gél Novex Zymogram (Invitrogen). Platne sa vyvíjali a farbili podľa odporúčania výrobcu. Pásky matrix-metaloproteináz (MMP) sa identifikovali na základe ich známych molekulových hmotností (Obrázok 6).

Zymogram kultivačných médií zo skúšok Matrigelovej invázie preukázal, že 20 µg/ml EGCG v médiách znižovalo produkciu MMP2 a úplne inhibovalo produkciu MMP9 (Obrázok 6). Pri koncentráciách EGCG 50 µg/ml a 100 µg/ml bola ako aktivita MMP2 tak aj aktivita MMP9 úplne inhibovaná (Obrázok 6).

Morfológia buniek

Príklad 7

Účinky EGCG a kombinácie kyseliny askorbovej, prolínu a lyzínu na bunkovú morfológiu ľudských melanómových buniek (A 2058)

Mikrografy rakovinových buniek v bazálnych médiách a ich migrácia cez Matrigel sú zobrazené na Obrázku 7. Začlenenie kombinácie kyseliny askorbovej (100 µM) + prolínu (140 µM) + lyzínu (400 µM) do médií menilo morfológiu buniek (Obrázok 8). Evidentná bola distenzia buniek so zreteľným rozšírením jadra. Pridanie 20 µg/ml EGCG ku kombinácii kyseliny askorbovej (100 µM) + prolínu (140 µM) + lyzínu (400 µM) v médiách spôsobovalo rozsiahle apoptotické zmeny (Obrázok 9).

Tieto zistenia opísané v príkladoch 1 až 7 ukazujú, že prostredníctvom EGCG sa uplatňoval silný synergický účinok, ak sa EGCG použil v kombinácii kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu. Tieto štúdie ukazujú teda prekvapujúci synergický účinok kombinácie EGCG a kyseliny askorbovej + prolínu +

lyzínu, čo umožňuje veľmi výhodne využiť anti-proliferáciu a anti-metastázovú aktivitu EGCG pri pomerne nízkej hladine jeho koncentrácie v tkanive.

Tieto predložené zistenia majú teda nesmierny význam, pretože môžu priblížiť účinnú hladinu katechínov bližšie k úrovni, ktorá sa dá dosiahnuť v tkanivách.

Bolo poukázané na to, že proliferácia rakovinových buniek a zlepšenie regulácie ich enzýmov je spôsobené zvýšenou koncentráciou druhov reaktívneho kyslíka (reactive oxygen species, ROS). V tejto situácii bude použitie kombinácií rozličných biologických antioxidantov, ako sú tokoferoly, karotinoidy, spolu s ďalšími facilitáčnymi činidlami, ako sú ubichinoly, biflavonoidy, kyselina lipocová, karnitín, poskytovať účinnejšie synergické zmesi na liečenie vyššie uvedených chorôb.

Predložený vynález poskytuje prekvapujúci poznatok, že kombinácia obsahujúca katechínové zlúčeniny by poskytovala synergickú aktivitu a tým umožňovala dosiahnuť vlastnú účinnú protirakovinovú aktivitu pri nižších hladinách katechínov v tkanivách. Vyššie uvedené zistenia otvárajú možnosť použitia rozličných zložiek v kombinácii s rôznymi zložkami pri účinných hladinách pri prevencii a liečení neoplastických ochorení.

Odborník skúsený v odbore si bude vedomý toho, že prolín a lyzín nie sú obmedzené len na prolín a lyzín. Rozsah predloženého vynálezu je mienený tak, že zahrnuje deriváty lyzínu a jeho prekuzory, deriváty prolínu a jeho prekuzory.

Odborník skúsený v odbore si bude vedomý toho, že antioxidant, kyselina askorbová, bude zahrňovať deriváty a prekuzory kyseliny askorbovej.

Ďalšie biologické antioxidanty zahrňujú tokoferoly a príbuzné zlúčeniny, kyselinu trans-retinóvu a príbuzné

zlúčeniny, karotinoidy a príbuzné zlúčeniny, glutatión a príbuzné zlúčeniny, ubichinoly a príbuzné zlúčeniny, foláty a príbuzné zlúčeniny, bioflavonoidy a príbuzné zlúčeniny, ako aj zlúčeniny selénu.

Klinické aplikácie

Vynález sa zameriava na preventívne a terapeutické použitie katechínu v kombinácii s antioxidantom, prolínom a lyzínom. Kombinované použitie katechínu s antioxidantom, prolínom a lyzínom zvyšuje účinnosť katechínovej zlúčeniny pri liečení humánných ochorení.

Humánne ochorenia zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na, neoplastické ochorenia, zápalové stavy, infekčné ochorenia, kardiovaskulárne choroby a ďalšie patologické stavy zahrnujúce degradáciu extra-celulárneho matrixu. Takéto stavy zahrnujú abnormálnu angiogézu, patologickú intravazáciu, reumatoidnú artritídu a osteoartritídu, aterosklerózu, dilatovanú kardiomyopatiu, emfyzém a ďalšie chronické stavy.

Predložený vynález poskytuje spôsob liečenia a prevencie humánných ochorení zahrnujúcich degradáciu extra-celulárneho matrixu, ako sú

- i) neoplastické ochorenia;
- ii) zápalové stavy (vrátane, ale bez obmedzenia na alergie, emfyzém, reumatoidnú artritídu a osteoartritídu, periodontitídu, neurodermatitídu);
- iii) infekčné ochorenia (vrátane, ale bez obmedzenia na vírusové infekcie, ako je bežné nachladnutie, chrípka, hepatitída, herpes, HIV; bakteriálne infekcie, ako je pneumónia, tuberkulóza, meningitída, kvapavka, syfilis a hubovité ochorenia);

- iv) kardiovaskulárne choroby (vrátane, ale bez obmedzenia na aterosklerózu, kardiomyopatiu, restenózu po angioplastike);
- v) degeneratívne ochorenia (vrátane, ale bez obmedzenia na osteoporózu a artritídu);
- vi) neurologické ochorenia (vrátane, ale bez obmedzenia na Alzheimerovu chorobu, sklerózu multiplex); a
- vii) ochorenia autoimunity (vrátane, ale bez obmedzenia na artritídu)

podávaním účinných množstiev kompozícií opísaných v tejto prihláške.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kompozícia biochemických látok, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahrnuje katechínovú zlúčeninu, antioxidant, prolín a lyzín, ktorá je účinná pri inhibícii matrix-metalloproteínázy.

.

2. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že katechínová zlúčenina je zvolená zo skupiny zahrnujúcej epikatechíny, epigalokatechín, epikatechíngalát a epigalokatechíngalát.

3. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že katechínovou zlúčeninou je epigalokatechíngalát.

4. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že antioxidant je zvolený zo skupiny zahrnujúcej kyselinu askorbovú, tokoferoly, tokotrienoly, karotinoidy, glutatión, kyselinu alfa-lipoovú, ubichinoly, bioflavonoidy a karnitín.

5. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že antioxidantom je kyselina askorbová.

6. Kompozícia podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že kyselina askorbová je zvolená zo skupiny zahrnujúcej prekurzory askorbátu, metabolity askorbátu a askorbátovú soľ.

7. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že antioxidant ďalej zahrnuje kyselinu listovú.

8. Kompozícia podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že kyselinou listovou je folát.

9. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že kompozícia ďalej zahrnuje selén.

10. Kompozícia podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že selén je zvolený zo skupiny zahrnujúcej seleničitan a metylselinát.

11. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že matrix-metaloproteínáza je zvolená zo skupiny zahrnujúcej matrix-metaloproteínázu 1, matrix-metaloproteínázu 2, matrix-metaloproteínázu 3, matrix-metaloproteínázu 4, matrix-metaloproteínázu 5, matrix-metaloproteínázu 6, matrix-metaloproteínázu 7, matrix-metaloproteínázu 8, matrix-metaloproteínázu 9, matrix-metaloproteínázu 10, matrix-metaloproteínázu 11, matrix-metaloproteínázu 12 a matrix-metaloproteínázu 14.

12. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že matrix-metaloproteínázou je matrix-metaloproteínáza 2.

13. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že matrix-metaloproteínázou je matrix-metaloproteínáza 9.

14. Spôsob liečenia humánnych ochorení súvisiacich so zvýšenou aktivitou matrix-metaloproteínázy, podávaním pacientovi, ktorý potrebuje takéto liečenie, kompozície biochemických látok zahrnujúcich katechínovú zlúčeninu, antioxidant, prolín a lyzín, ktorá je účinná pri inhibícii matrix-metaloproteínázy.

15. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že katechínová zlúčenina je zvolená zo skupiny

zahrnujúcej epikatechíny, epigalokatechín, epikatechíngalát a epigalokatechíngalát.

16. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že katechínovou zlúčeninou je epigalokatechíngalát.

17. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidant je zvolený zo skupiny zahrnujúcej kyselinu askorbovú, tokoferoly, tokotrienoly, karotinoidy, glutatión, kyselinu alfa-lipoovú, ubichinoly, bioflavonoidy a karnitín.

18. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidantom je kyselina askorbová.

19. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kyselina askorbová ďalej zahrnuje askorbát zvolený zo skupiny zahrnujúcej prekurzory askorbátu, metabolity askorbátu a askorbátové soli.

20. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidant ďalej zahrnuje kyselinu listovú.

21. Spôsob podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kyselinou listovou je folát.

22. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kompozícia ďalej zahrnuje selén.

23. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že selén je zvolený zo skupiny zahrnujúcej seleničitan a metylselinát.

24. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že humánne ochorenie je zvolené zo skupiny zahrnujúcej neoplastické ochorenia, zápalové ochorenia, infekčné ochorenia, kardiovaskulárne choroby, degeneratívne ochorenia, neurologické ochorenia a ochorenia autoimunity.

25. Spôsob liečenia neoplastických ochorení súvisiacich s nadmernou degradáciou extracelulárneho matrixu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje podávanie účinného množstva kompozície obsahujúcej katechínovú zlúčeninu, antioxidant, prolín a lyzín.

26. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že katechín je zvolený zo skupiny zahrnujúcej epikatechíny, epigalokatechín, epikatechíngalát a epigalokatechín-galát.

27. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že katechínom je epigalo-katechíngalát.

28. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidant je zvolený zo skupiny zahrnujúcej kyselinu askorbovú, tokoferoly, tokotrienoly, karotinoidey, glutatión, kyselinu alfa-lipoovú, ubichinoly, bioflavonoidey a karnitín.

29. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidantom je kyselina askorbová.

30. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kyselina askorbová ďalej zahrnuje prekurzory askorbátu, metabolity askorbátu a askorbátovú soľ.

31. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že antioxidant ďalej zahrnuje je kyselinu listovú.

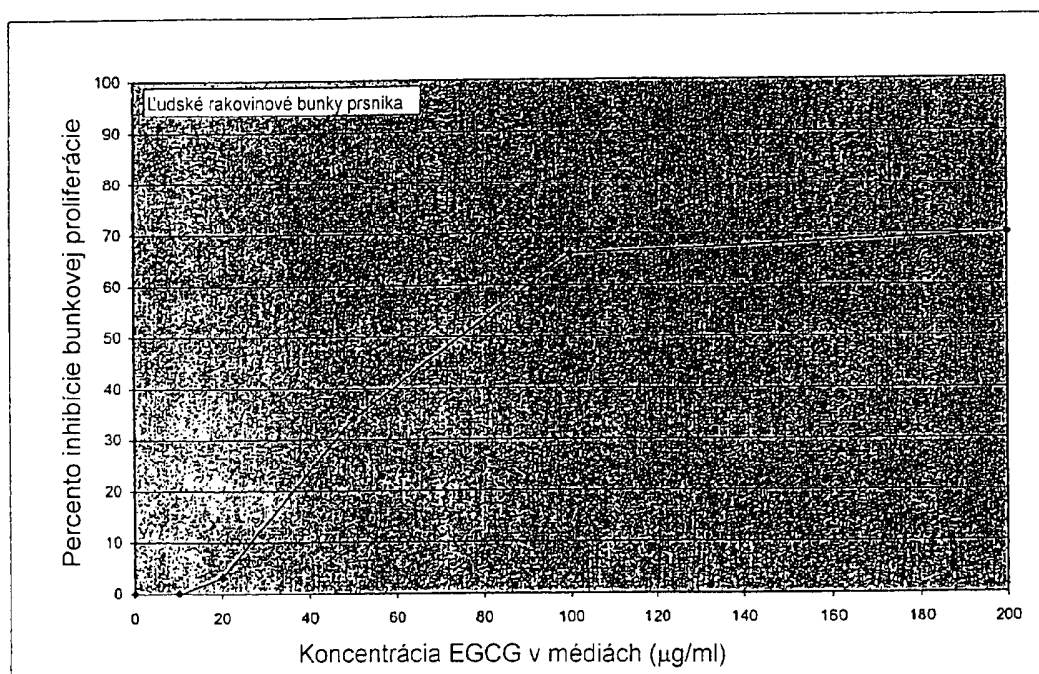
32. Spôsob podľa nároku 31, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kyselinou listovou je folát.

33. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kompozícia ďalej zahrnuje selén.

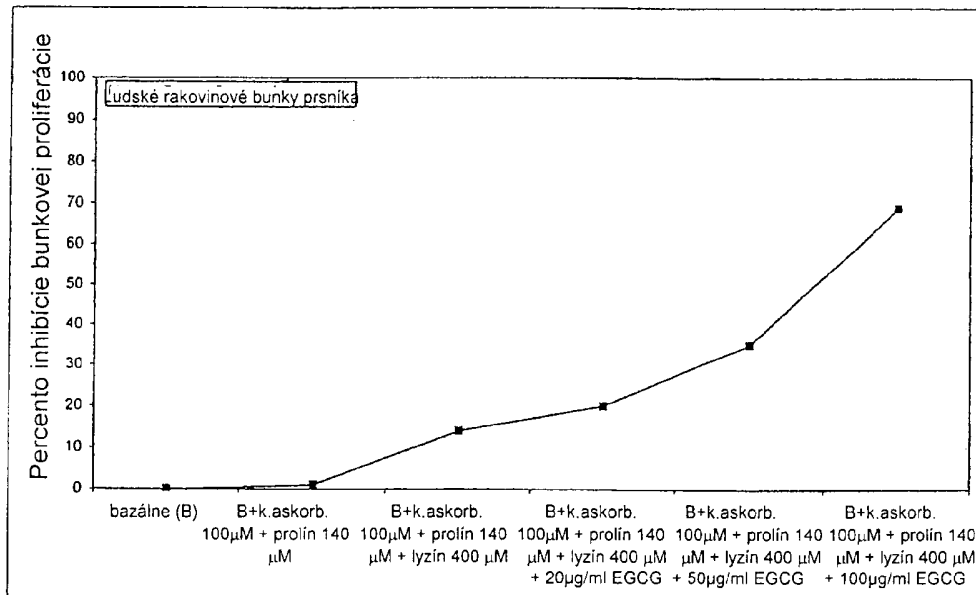
34. Spôsob podľa nároku 33, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že selén je zvolený zo skupiny zahrnujúcej seleničitan a metylselinát.

35. Farmakologický prípravok podľa nároku 1.

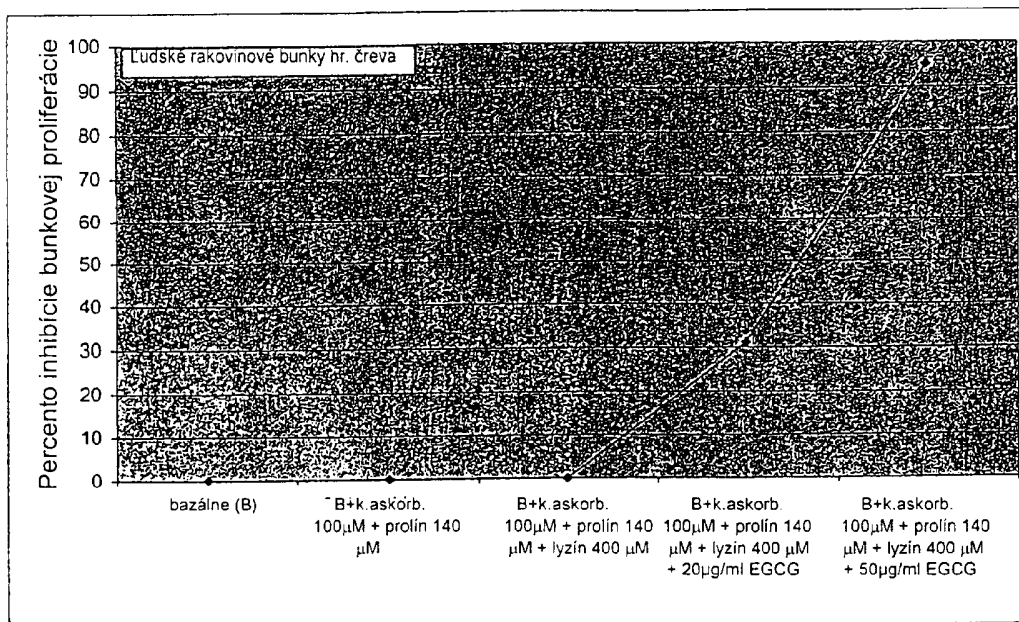
36. Farmaceutický prípravok/prípravky podľa nároku 1, v y z - n a č u j ú c i s a t ý m, že farmakologický prípravok sa používa na orálne podávanie alebo na topickú aplikáciu.



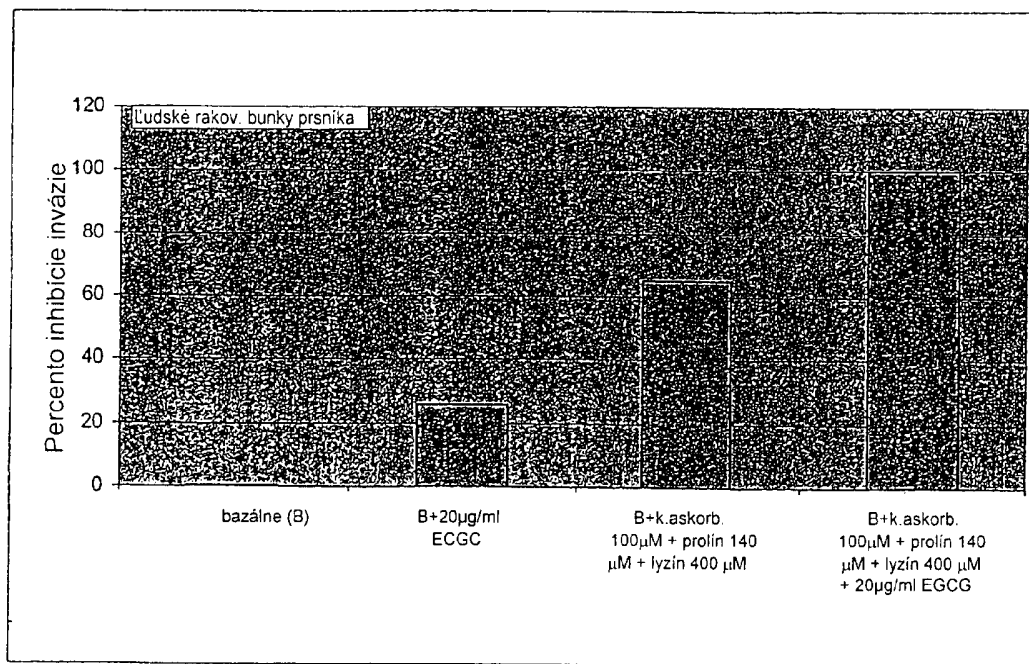
Obr. 1: Inhibičné účinky rozličných koncentrácií epigalokatechíngalátu (EGCG) na bunkovú proliferáciu ľudských rakovinových buniek prsníka



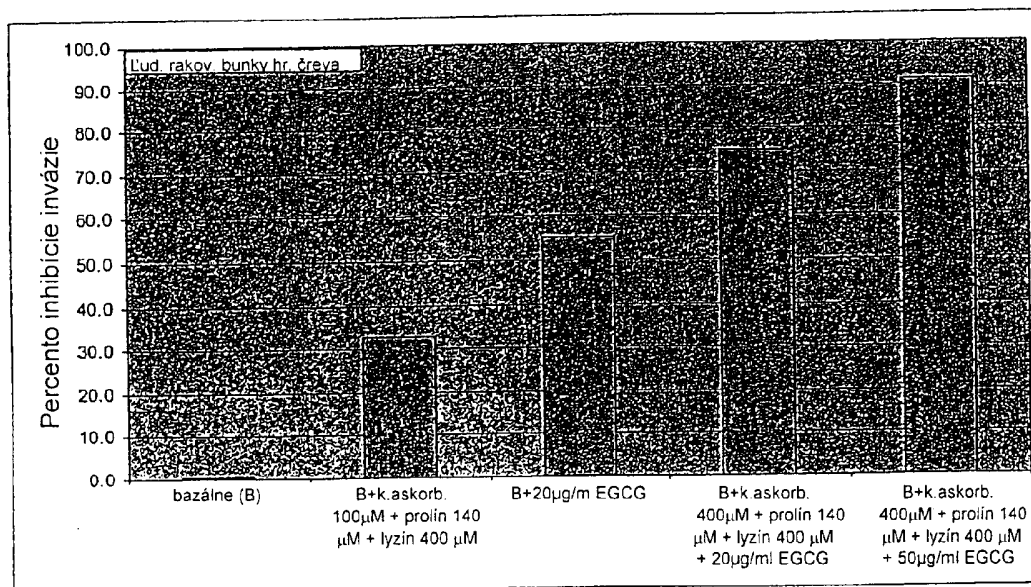
Obr. 2: Inhibičné účinky kombinácie kyseliny askorbovej + prolínu; kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu; kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu + rozličných koncentrácií epigalokatechíngalátu (EGCG) na bunkovú proliferáciu rakovinových buniek prsníka



Obr. 3: Inhibičné účinky kyseliny askorbovej + prolínu; kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu; kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu + rozličných koncentrácií epigalokatechíngalátu (EGCG) na bunkovú proliferáciu rakovinových buniek hrubého čreva



Obr. 4: Synergický inhibičný účinok kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu a epigalokatechíngalátu (EGCG) na Matrigelovú inváziu ľudskými rakovinovými bunkami prsníka



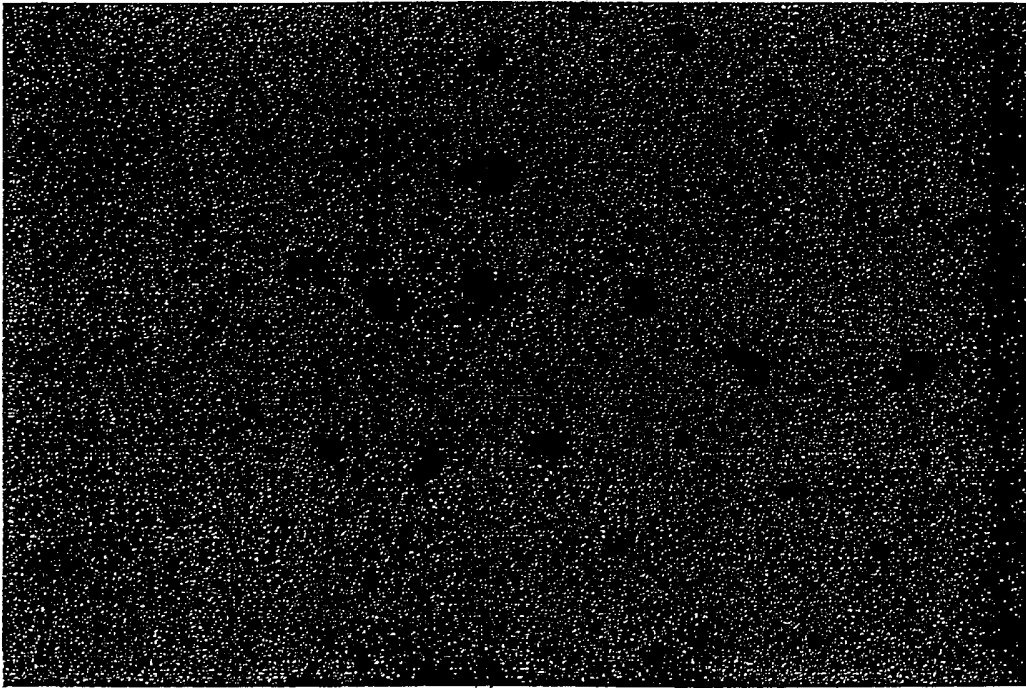
Obr. 5: Synergický inhibičný účinok kyseliny askorbovej + prolínu + lyzínu a epigalokatechíngalátu (EGCG) na Matrigelovú inváziu ľudskými rakovinovými bunkami hrubého čreva

Pruhy 1 2 3 4 5 6

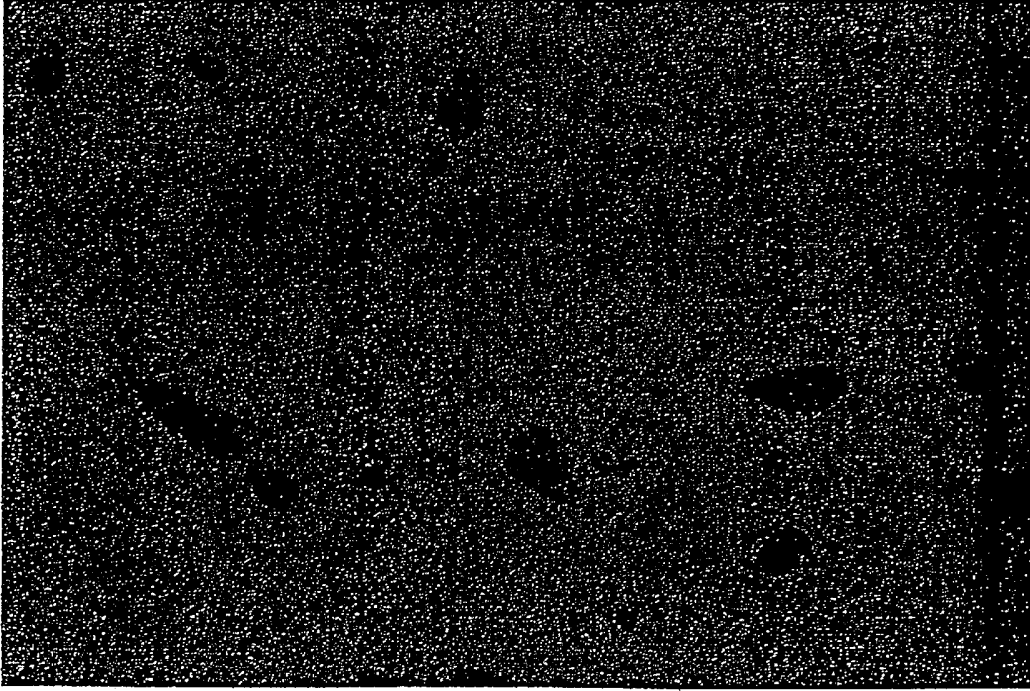


Obr. 6: Inhibičný účinok kyseliny askorbovej 100 μ M + prolínu 140 μ M + lyzínu 400 μ M a rozličných koncentrácií epigalokatechíngalátu (EGCG), na produkciu MMP2 ľudskými rakovinovými bunkami prsníka

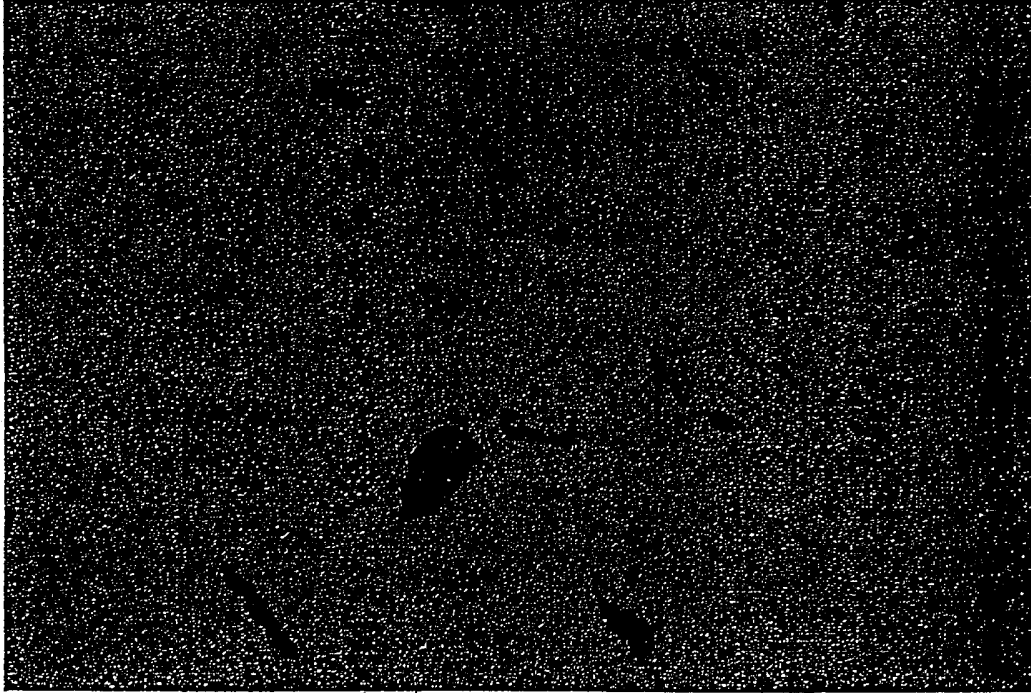
Pruh 1, bazálny; Pruh 2, bazálny + kyselina askorbová 100 μ M + prolín 140 μ M + lyzín 400 μ M; Pruh 3, bazálny + kyselina askorbová 100 μ M + prolín 140 μ M + lyzín 400 μ M + EGCG 20 μ g/ml; Pruh 4, bazálny + kyselina askorbová 100 μ M + prolín 140 μ M + lyzín 400 μ M + EGCG 50 μ g/ml; Pruh 5, bazálny + kyselina askorbová 100 μ M + prolín 140 μ M + lyzín 400 μ M + EGCG 100 μ g/ml; Pruh 6, bazálny + EGCG 20 μ g/ml.



Obr. 7: Normálne melanómové bunky



Obr. 8: Apoptotický účinok prídania kyseliny askorbovej 100 μM , prolínu 140 μM a lyzínu 400 μM na melanómové bunky. Bunky sú rozšírené a jadro je tmavšie sfarbené.



Obr. 9: Apoptotický účinok pridanej kyseliny askorbovej 100 μ M, prolínu 140 μ M a lyzínu 400 μ M a EGCG 20 μ g/ml na melanómové bunky. Bunky sú skolabované.