



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 519**

51 Int. Cl.:
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 36/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03729250 .5**
86 Fecha de presentación : **13.01.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1465614**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **Formulación farmacéutica de nutrientes que comprende polifenoles y uso en el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **11.01.2002 US 348143 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Matthias Rath**
Sourethweg 9
6422 PC Heerlen, NL

72 Inventor/es: **Rath, Matthias;**
Netke, Shirang y
Niedzwiecki, Aleksandra

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 298 519 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

Formulación farmacéutica de nutrientes que comprende polifenoles y uso en el tratamiento del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica de nutrientes y a su uso para el tratamiento del cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que contienen polifenoles, que tienen una cantidad eficaz de polifenoles para el tratamiento del cáncer. La formulación de la presente invención se usa como un agente para la prevención y el tratamiento del cáncer que comprende ácido ascórbico, lisina, prolina y al menos un compuesto polifenólico seleccionado del grupo que consiste en galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina y catequina.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo industrializado. No existe un tratamiento específico y causal para el cáncer y la mortalidad por cáncer está entre las más altas de todas las enfermedades. Los tratamientos más ampliamente usados, quimioterapia y radioterapia, no distinguen entre el tejido sano y el cáncer, y están asociados con efectos secundarios graves. Por lo tanto, es necesario un tratamiento selectivo del cáncer.

Uno de los mecanismos clave que usan las células de cáncer con el fin de expandirse y metastatizar en el cuerpo implica la destrucción enzimática de los tejidos conjuntivos que lo rodean. Los procedimientos terapéuticos para controlar este proceso mediante fármacos específicos no han tenido éxito y actualmente no hay medios disponibles para controlar la metástasis del cáncer. Los protocolos de tratamiento actuales con quimioterapia y radioterapia se centran en la destrucción de células cancerosas en el cuerpo, y no se dirigen a la metástasis. Además, estos tratamientos son tóxicos, no son específicos y están asociados con efectos secundarios graves. La quimioterapia y radioterapia conllevan el riesgo de desarrollar nuevos cánceres y mediante la destrucción del tejido conjuntivo en el cuerpo pueden facilitar la invasión del cáncer.

Con el fin de crecer y expandirse a otras partes del cuerpo, las células cancerosas degradan la matriz extracelular mediante diferentes metaloproteasas de la matriz (MMP) y plasmina, cuyas actividades se han correlacionado con la agresividad del crecimiento tumoral. Rath y Pauling (1992) postularon que nutrientes tales como un aminoácido, lisina y ácido ascórbico, pueden actuar como inhibidores naturales de la proteólisis de la matriz extracelular y como tales tienen el potencial de modular el crecimiento y la expansión tumoral. Estos nutrientes pueden ejercer su potencial antitumoral por varios mecanismos, entre ellos por inhibición de las MMP y por el fortalecimiento del tejido conjuntivo que rodea las células cancerosas (efecto de "encapsulación" del tumor).

La patente de EE.UU. n° 5.962.517 describe una composición farmacéutica para una indicación médica diferente (tratamiento del acné). La composición descrita comprende un componente de reducción del acné, al menos uno de raíz de bardana-raíz de acedera amarilla, o una composición basada en catequinas; y un componente de acondicionamiento celular de la piel que comprende un metal de transición. No se muestra que la composición descrita tenga ningún valor beneficioso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

El documento PCT WO 00/76492 describe una formulación de nutrientes para reducir la enfermedad, que contiene un compuesto de catequina. Sin embargo, se ha mostrado que la biodisponibilidad de los compuestos de catequina es pequeña (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)), y el documento PCT WO 00/76492 no describe medios para aumentar la biodisponibilidad como se requiere en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

El documento PCT WO 00/57875 describe el uso de catequinas para el tratamiento del cáncer.

Demeule *et al.* describen que las catequinas del té verde pueden tener efectos inhibidores en las metaloproteasas de la matriz. No se sugiere ni se enseña como usar las catequinas en el tratamiento y/o prevención del cáncer. Debido a que la biodisponibilidad de los polifenoles en seres humanos es extremadamente baja, la baja concentración de catequinas en los tejidos reduce mucho el valor terapéutico de los polifenoles incluyendo el galato de epigallocatequina (EGCG). Hay una necesidad constante de encontrar una composición farmacéutica de nutrientes mejor que contenga polifenoles que sea eficaz en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y otras enfermedades incluyendo enfermedades inflamatorias.

Se necesitan procedimientos naturales seguros y eficaces que se puedan usar para controlar el proceso de expansión del cáncer en el cuerpo. También se necesita una medida preventiva contra el desarrollo del cáncer o tumores benignos en seres humanos, y que dicha medida se pueda aplicar a pacientes sin riesgo de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de nutrientes se han hecho populares a medida que ha aumentado la incidencia del cáncer en los últimos tiempos. La necesidad de dicha composición continuará y aumentará.

Sumario de la invención

En un objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes útil en el tratamiento del cáncer, que comprende: a) un compuesto ascórbico; b) un compuesto de L-lisina; c) un compuesto de L-prolina; y d) al menos un compuesto polifenólico seleccionado del grupo que consiste en galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina y catequina. Los compuestos a-c) potencian la actividad del compuesto polifenólico en el bloqueo de la proliferación y metástasis del cáncer.

Preferiblemente, el compuesto ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, sales de ascorbato farmacéuticamente aceptables, ésteres de ascorbato y/o mezclas de los mismos. Preferiblemente, la sal de ascorbato farmacéuticamente aceptable es ascorbato de calcio o ascorbato de magnesio. Más preferiblemente, el éster de ascorbato es palmitato de ascorbilo. Preferiblemente, el compuesto de lisina se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de lisina y sales de lisina farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, el compuesto de prolina se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de prolina y sales de prolina farmacéuticamente aceptables.

En otro objetivo, la presente composición farmacéutica de nutrientes comprende además oligoelementos seleccionados del grupo que consiste en selenio, cobre, manganeso, calcio y magnesio.

En otro objetivo, la presente composición farmacéutica de nutrientes además comprende un aminoácido. Preferiblemente, el aminoácido es arginina. Más preferiblemente, la presente composición farmacéutica de nutrientes comprende además N-acetil-cisteína.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes útil en el tratamiento del cáncer, que comprende: a) un compuesto ascórbico; b) un compuesto de L-lisina; c) un compuesto de L-prolina; d) N-acetil-cisteína; y e) al menos un compuesto polifenólico seleccionado del grupo que consiste en galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina y catequina. Los compuestos a-d) potencian la actividad del compuesto polifenólico en el bloqueo de la proliferación y metástasis del cáncer.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 300 μ g de selenio, 2 mg de cobre y 1 mg de manganeso.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 25 mg de ácido ascórbico, 25 mg de ascorbato de calcio, 25 mg de ascorbato de magnesio, 25 mg de palmitato de ascorbilo, 200 mg de polifenoles, 10 mg de N-acetil-cisteína, 50 mg de lisina, 25 mg de prolina, 50 mg de arginina, 1 mg de selenio, 2 μ g de cobre y 50 μ g de manganeso.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 5.000 mg de ácido ascórbico, 5.000 mg de ascorbato de calcio, 5.000 mg de ascorbato de magnesio, 5.000 mg de palmitato de ascorbilo, 5.000 mg de polifenoles, 1.500 mg de N-acetil-cisteína, 5.000 mg de lisina, 3.000 mg de prolina, 3.000 mg de arginina, 200 μ g de selenio, 9 mg de cobre y 10 mg de manganeso.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 100 μ g de selenio, 2 mg de cobre, 1 mg de manganeso, 500 mg de calcio y 400 mg de magnesio.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 100 μ g de selenio, 2 mg de cobre, 1 mg de manganeso, 500 mg de calcio, 400 mg de magnesio y 200 mg de bioflavonoides cítricos.

En otro objetivo más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes útil en el tratamiento del cáncer, que comprende: L-lisina, L-prolina, L-arginina, ácido ascórbico, calcio, magnesio, polifenoles, N-acetil-cisteína, selenio, cobre y manganeso.

En otro objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende 1.000 mg de L-lisina, 750 mg de L-prolina, 500 mg de L-arginina, 710 mg de ácido ascórbico, 22 mg de calcio, 50 mg de magnesio, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 30 μ g de selenio, 2 mg de cobre y 1 mg de manganeso.

En otro objetivo, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo las composiciones farmacéuticas de nutrientes descritas. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de tipo melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer cerebral.

En otro objetivo, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo la composición farmacéutica de nutrientes descrita. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria es la osteoartritis.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los efectos inhibidores de polifenoles, ascorbato, prolina y lisina en el comportamiento de migración de células de cáncer de mama humano.

10 La figura 2 representa los efectos inhibidores de polifenoles, ascorbato, prolina y lisina en el comportamiento de migración de células de cáncer de colon humano.

La figura 3 representa los efectos inhibidores de polifenoles, ascorbato, prolina y lisina en el comportamiento de migración de células de melanoma humano.

15 La figura 4 representa los efectos inhibidores de polifenoles, ascorbato, prolina y lisina en la apoptosis de células de melanoma humano.

20 La figura 5 representa los efectos inhibidores de ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG en la proliferación celular de células de melanoma humano (A 2058).

La figura 6 representa los efectos inhibidores de EGCG en la proliferación celular de células de cáncer de mama humano (MDA-MB 231)

25 La figura 7 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la proliferación celular de células de cáncer de mama humano (MDA-MB 231).

La figura 8 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la proliferación celular de células de cáncer de colon humano (HCT 116).

30 La figura 9 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMP) en células de melanoma humano.

35 La figura 10 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la invasión de Matrigel por las células de cáncer de mama humano (MDA-MB 231).

La figura 11 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la invasión de Matrigel por las células de cáncer de colon humano (HTC 116).

40 La figura 12 representa los efectos de complementar el medio base con ácido ascórbico, prolina, lisina y diferentes cantidades de EGCG, en la reducción del número de células invasoras en las células de melanoma humano (A 2058).

Descripción detallada de la invención

45 Tal como se usa en esta memoria, "lisina" se usa de forma intercambiable con L-lisina, "prolina" se usa de forma intercambiable con L-prolina, "arginina" se usa de forma intercambiable con L-arginina, "vitamina C" se usa de forma intercambiable con ácido ascórbico y puede incluir sales de ascorbato o ésteres de ascorbato. "MMP" se refiere a metaloproteasas de la matriz, p. ej., MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11 etc., "EGCG" se refiere a 3-galato de (-)-epigallocatequina que es el principal constituyente polifenólico presente en el té verde. "NHDF" se refiere al fibroblasto dérmico humano normal, incluyendo condrocitos y células de estroma humano.

55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica de nutrientes que comprende ácido ascórbico, lisina, prolina y al menos un compuesto polifenólico. Preferiblemente, el compuesto de ascorbato se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, sales de ascorbato y ésteres de ascorbato. Preferiblemente, la lisina es hidrocloreto de lisina o sales de lisina farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, la prolina es hidrocloreto de prolina o sales de prolina farmacéuticamente aceptables.

60 Los compuestos polifenólicos son extractos de té verde. También se conocen como catequinas. Los polifenoles están presentes en el té verde y se ha sugerido que proporcionan protección frente a una variedad de enfermedades incluyendo el cáncer (Mukhtar H., Ahmed N., *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1698S-1702S (2000)). La administración oral de té verde potencia los efectos inhibidores de tumor de la doxorubicina en ratones. La potencial actividad anticancerígena de las catequinas puede estar relacionada con sus efectos en varios factores implicados en la proliferación de células cancerosas y su metástasis. Se sabe que las catequinas producen la detención del ciclo celular en células de carcinoma humano (Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Mukhtar H.J., *Natl. Cancer Inst.* 89:1881-1886 (1997)). La fracción polifenólica del té verde también está implicada en la protección frente a la inflamación y las citoquinas inducidas por tumores.

ES 2 298 519 T3

Los compuestos polifenólicos están presentes en el té verde como el 30% en peso seco. Incluyen flavanoles, flavanodoles, flavonoides y ácidos fenólicos. Los flavanoles son los más abundantes entre los polifenoles en el té verde y se conocen en general como catequinas. Hay cuatro catequinas principales en el té verde: 1) (-)-epicatequina, 2) 3-galato de (-)-epicatequina, 3) (-)-epigallocatequina, y 4) 3-galato de (-)-epigallocatequina (EGCG). Entre las catequinas, el EGCG es el principal constituyente polifenólico presente en el té verde. El EGCG es un potente compuesto antioxidante y puede atribuir al té verde la actividad anticancerígena. Se ha descrito que los compuestos de catequina ejercen su actividad antimetastática previniendo el proceso de angiogénesis (Cao Y., Cao R., *Nature* 398:381 (1999)). También se ha mostrado que el EGCG interfiere con la actividad de la uroquinasa (activador del u-plasminógeno) (Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak J.E., *Nature*: 387-567 (1997)), una de las enzimas expresadas con más frecuencia en los cánceres humanos, El EGCG es un compuesto polifenólico preferido.

Preferiblemente, el compuesto polifenólico se selecciona del grupo que consiste en galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina, catequina y otras sales de polifenoles farmacéuticamente aceptables y/o mezclas de los mismos.

Uno de los objetivos terapéuticos principales de esta solicitud de patente es la prevención de la digestión de la matriz extracelular y su restauración. El ácido ascórbico o su sal (es decir, el ascorbato) es necesario para la síntesis del colágeno, elastina y otras moléculas clave de la matriz extracelular.

Preferiblemente, se usa una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina para potenciar la actividad anticancerígena de los compuestos polifenólicos. Más preferiblemente, la combinación potencia los compuestos polifenólicos que incluyen el galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina, catequina, de modo que el compuesto polifenólico es eficaz para reducir la invasión de células cancerosas o bloquear completamente la invasión.

Sin ligarse a ninguna teoría, la presente formulación farmacéutica de nutrientes contiene una mezcla de ingredientes que incluyen polifenoles y se encuentra que la mezcla funciona eficazmente en el bloqueo de los procesos de proliferación y metástasis. Los autores de la invención han encontrado que la presente composición de formulación de nutrientes reduce significativamente la invasión de las células de cáncer o bloquea la metástasis de las células de cáncer completamente. Por lo tanto, esta composición previene de forma eficaz que estas células se extiendan. El uso terapéutico del compuesto reivindicado es un tratamiento eficaz, selectivo y seguro del cáncer de mama, colon y otros órganos. Preferiblemente, la composición farmacéutica de nutrientes descrita puede contener dos de los componentes que están unidos covalentemente.

Preferiblemente, la eficacia de la composición de nutrientes se potencia incluyendo compuestos que se sabe que afectan de forma beneficiosa al crecimiento e invasión del cáncer y otros tumores, incluyendo L-arginina y/o compuestos que contienen arginina. Más preferiblemente, se usa N-acetil-cisteína. Más preferiblemente, se usan una sal de selenio, una sal de cobre y una sal de manganeso que son eficaces para prevenir y tratar el cáncer y otros tumores. Esta composición también puede incluir uno o más compuestos necesarios como coenzima en el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria o para otras funciones metabólicas de las células en una cantidad eficaz para prevenir y tratar el cáncer y otros tumores.

La presente composición farmacéutica de nutrientes se puede administrar a un paciente en forma de cápsulas, comprimidos, polvos, píldoras, inyecciones, infusiones, inhalaciones, supositorios u otros vehículos y/o medios de suministro farmacéuticamente aceptables, para prevenir y tratar el cáncer y otros tumores. Preferiblemente, la composición farmacéutica de nutrientes se administra en forma de cápsulas, comprimidos o polvos. Más preferiblemente, se administra en forma de cápsulas.

La presente composición farmacéutica de nutrientes se puede usar para prevenir y tratar el cáncer y otros tumores en un paciente seleccionado, en el que el tumor o cáncer está localizado en el pecho, ovarios, cuello de útero u otros órganos del sistema reproductor femenino, pulmón, hígado, piel, sistema gastrointestinal, cerebro, huesos u otros órganos del cuerpo. Preferiblemente, la composición se usa en el cáncer de pulmón y cáncer de mama.

La presente composición farmacéutica de nutrientes también se puede usar para prevenir y tratar enfermedades infecciosas, aterosclerosis, reestenosis, otras enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria es la osteoartritis.

Activación de plasmina mediada por MMP: Se especula que la lisina puede afectar a la actividad de las MMP por mecanismos mediados por plasmina, aunque no se excluyen otros mecanismos. Las MMP son segregadas como proenzimas y su activación es mediada parcialmente por la plasmina y la realización requiere la forma activa de MMP-3. El mecanismo de activación de diferentes MMP detallado por Nagasa (1997) indica que la MMP-3 también requiere la conversión del plasminógeno en su forma activa, la plasmina. El centro de unión activo del plasminógeno tiene los sitios en los que la lisina se une específicamente. Por lo tanto, la lisina puede interferir con la activación del plasminógeno en plasmina por el activador de plasminógeno (Rath y Pauling, 1992), por unión a los sitios activos del plasminógeno. El ácido tranexámico, un análogo sintético de la lisina, se ha usado para inhibir la proteólisis inducida por plasmina por este mecanismo.

Puesto que la actividad de la plasmina es esencial para inducir varias MMP tisulares, la lisina puede interferir con la conversión del plasminógeno en plasmina y así puede inhibir la activación de casi todas las MMP. Además, el EGCG puede ejercer un efecto inhibitorio en la degradación de la matriz extracelular por inhibición de la MMP-2.

5 *Invasión del cáncer y papel de la matriz:* También se puede afectar a la invasión de la matriz por las células cancerosas aumentando la estabilidad y resistencia del tejido conjuntivo que rodea las células cancerosas, y contribuyendo a la “encapsulación” del tumor. Esto requiere optimizar la síntesis y estructura de las fibrillas de colágeno, para lo cual es esencial la hidroxilación de los restos de hidroxiprolina e hidroxilisina en las fibras de colágeno. El ácido ascórbico puede ser esencial para la hidroxilación de estos aminoácidos. El ácido ascórbico y la L-lisina normalmente no se producen en el cuerpo humano, por lo tanto puede darse un nivel por debajo del óptimo de estos nutrientes en diferentes estados patológicos así como por dietas inadecuadas. Aunque la prolina se puede sintetizar a partir de la arginina, en afecciones patológicas su síntesis o hidroxilación pueden estar afectadas. Así pues, se ha mostrado que el contenido de hidroxiprolina del tejido tumoral metastático es mucho menor que el del tejido tumoral no metastático (Chubainskaia *et al.*, 1989). Una variedad de fármacos que reducen la metástasis también aumentan el contenido de hidroxiprolina de los tejidos (Chubainskaia *et al.*, 1989). Se ha encontrado que el contenido de hidroxiprolina urinaria de los pacientes de cáncer es mayor que el de las personas sanas o pacientes sin cáncer (Okazaki y col., 1992). Todos estos descubrimientos sugieren efectos adversos de las células cancerosas en el metabolismo de la prolina y la posible deficiencia condicionada de prolina en los pacientes de cáncer.

20 Los pacientes de cáncer pueden tener niveles insuficientes de ácido ascórbico. El ácido ascórbico puede ser citotóxico para las líneas celulares malignas y ejerce acción antimetastática. La presente invención describe que una combinación de ácido ascórbico, prolina, lisina y al menos un compuesto polifenólico ejerce un potente efecto antiproliferativo y antimetastático en las líneas celulares de cáncer. Preferiblemente, la presente formulación farmacéutica de nutrientes es eficaz contra las células de melanoma, cáncer de mama y cáncer de colon. Más preferiblemente, la presente formulación farmacéutica es eficaz contra las células de cáncer de colon humano.

30 Compuestos polifenólicos (catequinas): el EGCG representa una de las catequinas en el extracto de té verde y puede tener efectos inhibidores contra las células de cáncer humano. El mecanismo subyacente exacto no está claro. La presente invención describe una sinergia sorprendente en la formulación farmacéutica de nutrientes que comprende ácido ascórbico, prolina y lisina y al menos un compuesto polifenólico, en el bloqueo eficaz de la proliferación y metástasis de células de cáncer.

35 La composición farmacéutica de nutrientes de la presente invención bloquea eficazmente la invasión del cáncer de mama, colon, piel (melanoma) y otras formas de cáncer. Los ingredientes presentes en la formulación de nutrientes son compuestos naturales; y cuando se usan en el intervalo reivindicado como se describe en la solicitud, se muestra que no tienen efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, esta composición también se puede usar de forma profiláctica, es decir, para la prevención eficaz del cáncer y otros tumores en el cuerpo.

40 Puesto que las células víricas y otros microorganismos invasivos usan proteasas similares a las de las células de cáncer para expandir la infección por el cuerpo, la composición reivindicada en esta patente se puede usar en la prevención eficaz y el tratamiento de enfermedades víricas y otras enfermedades infecciosas.

45 Un mecanismo similar de activación de las metaloproteasas de la matriz que usan las células cancerosas para la invasión de la matriz, también contribuye a la desestabilización de placas ateroscleróticas que conducen a infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares. Por lo tanto, la composición reivindicada en esta patente también se puede usar para la prevención y tratamiento eficaces de la aterosclerosis, reestenosis y otras complicaciones cardiovasculares.

50 La activación de las metaloproteasas de la matriz que usan las células de cáncer para la invasión de la matriz, es un componente clave en diferentes afecciones inflamatorias. Por lo tanto, la composición reivindicada en esta patente también se puede usar para la prevención y el tratamiento eficaces de enfermedades tales como la artritis reumatoide, enfisema, alergias, osteoartritis y otras afecciones que incluyen aspectos inflamatorios.

55 La composición farmacéutica de nutrientes de la presente invención se puede proporcionar a un paciente en forma de comprimidos, píldoras, inyecciones, infusiones, inhalaciones, supositorios u otros vehículos y/o medios de suministro farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos

60 Se estudiaron los efectos del ácido ascórbico, lisina, prolina y al menos un compuesto polifenólico por su potencial antiproliferativo y antiinvasivo en diferentes líneas celulares de cáncer humano. Más en particular, se examinó uno de los ingredientes del extracto de té verde (es decir, el galato de epigallocatequina (EGCG)).

Materiales y métodos

65 Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, células de cáncer de colon humano HCT 116, línea celular de melanoma humano A2058 se obtuvieron de ATCC. Los fibroblastos dérmicos humanos normales se obtuvieron de GIBCO. Cuando no se indica, se usaron los medios de cultivo obtenidos de ATCC.

ES 2 298 519 T3

En los estudios de proliferación de células cancerosas cada tratamiento se repitió ocho veces. En los ensayos de invasión, cada tratamiento se llevó a cabo en tres o cuatro repeticiones.

Estudios de proliferación celular

5 En estos estudios, se hicieron crecer 5×10^4 células de cáncer de mama en medio de Liebovits con suero bovino fetal (FBS) al 10% en placas de 24 pocillos. El medio se usó como tal (medio base) o con los complementos indicados. Las placas se incubaron en un incubador con circulación de aire (sin CO_2 complementario) durante 4 días. Las células de cáncer de colon HCT116 se hicieron crecer en medio McCoy 5A y se mantuvieron en un incubador con circulación de aire con CO_2 al 5%. Al final del periodo de incubación, se extrajo el medio y las células en los pocillos se lavaron con PBS seguido de incubación durante 3 horas con colorante MTT. Se añadió dimetilsulfóxido (DMSO, 1 ml) a cada pocillo. Las placas con DMSO se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave y después se midió la DO de la solución en cada pocillo a 550 nm. La DO_{550} de la solución de DMSO en el pocillo se consideró que era directamente proporcional al número de células. La DO_{550} del tratamiento que no contenía ningún complemento (medio base) se consideró que era 100.

Estudios de invasión de Matrigel

20 Los estudios se llevaron a cabo usando insertos de Matrigel (Becton Dickinson) en placas de 24 pocillos compatibles. Se sembraron fibroblastos y se hicieron crecer en los pocillos de la placa usando DMEM. Cuando los fibroblastos alcanzaron la confluencia, se extrajo el medio y se sustituyó por $750 \mu\text{l}$ del medio indicado para el tratamiento. Las células de cáncer (5×10^4) suspendidas en $250 \mu\text{l}$ de medio complementado con nutrientes como se especifica en el diseño del experimento, se sembraron sobre el inserto en el pocillo. Así, tanto el medio sobre el inserto como en el pocillo contenían los mismos complementos. Después, las placas con los insertos se incubaron (en incubador con circulación de aire para las células MDA-MB-231 e incubador con CO_2 al 5% para las células de cáncer de colon y células de melanoma) durante 18-20 horas. Después de incubación, se extrajo el medio de los pocillos. Las células en la superficie superior de los insertos se quitaron suavemente con una torunda de algodón. Las células que habían penetrado la membrana de Matrigel y habían migrado a la superficie inferior del Matrigel se tiñeron con colorante Hemacolor (EM Sciences) y se contaron visualmente con el microscopio. Los resultados se sometieron a ANOVA y se ensayó la significancia con $p < 0,05$ para todas las posibles parejas.

Los medios en diferentes estudios se complementaron con ácido ascórbico, prolina, lisina y EGCG con las concentraciones indicadas.

Zimografía de gelatinasa

35 La zimografía de gelatinasa se llevó a cabo en gel de poliacrilamida profundido Novex al 10% (Invitrogen) en presencia de gelatina al 0,1%. Se cargó el medio de cultivo ($20 \mu\text{l}$) y se llevó a cabo la SDS-PAGE con tampón de SDS con tris-glicina. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con Triton X-100 al 5% durante 30 minutos y se tiñeron. Los patrones de las proteínas se hicieron correr simultáneamente y se determinaron los pesos moleculares aproximados.

Ejemplo 1

45 Se sembraron células de cáncer de mama MDA-MB 231 (ATCC) sobre inserto de Matrigel en una cámara de invasión de Matrigel mejorada (BD). Se añadió al pocillo medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos normales (Clonetics) complementado con diferentes agentes (como se indica en la figura 1). La cámara se incubó durante 24 horas y se contaron las células que habían invadido la membrana de Matrigel y habían migrado a la superficie inferior de la membrana. Estos datos muestran el efecto inhibitor del galato de epigallocatequina y la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina en la invasión de Matrigel y migración por las células de cáncer de mama humano MDA-MB 231.

Ejemplo 2

55 Se sembraron células de cáncer de colon humano HTCT116 (ATCC) sobre inserto de Matrigel en una cámara de invasión de Matrigel mejorada (BD). Se añadió al pocillo medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos normales (Clonetics) complementado con diferentes agentes (como se indica en la figura 2). La cámara se incubó durante 24 horas y se contaron las células que habían invadido la membrana de Matrigel y habían migrado a la superficie inferior de la membrana. Estos datos muestran un efecto inhibitor del galato de epigallocatequina y la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina en la invasión de Matrigel y migración por las células de cáncer de colon humano HCT116.

65

ES 2 298 519 T3

Ejemplo 3

Se sembraron células de melanoma humano A2058 (ATCC) sobre inserto de Matrigel en una cámara de invasión de Matrigel mejorada (BD). Se añadió al pocillo medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos normales (Clonetics) complementado con diferentes agentes. La cámara se incubó durante 24 horas y se contaron las células que habían invadido la membrana de Matrigel y habían migrado a la superficie inferior de la membrana. Estos datos muestran un efecto inhibitor del galato de epigallocatequina y la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina en la invasión de Matrigel y migración por las células de melanoma humano A2058.

Ejemplo 4

En este experimento se sembraron células de melanoma humano A2058 (ATCC) sobre inserto de Matrigel en una cámara de invasión de Matrigel mejorada (BD) en presencia de:

A: Medio condicionado de fibroblastos dérmicos humanos normales (Clonetics) y

B: el mismo medio complementado con diferentes nutrientes como se indica en las leyendas de la figura 4. Después de 24 horas de incubación se observaron con microscopio y se contaron las células que habían invadido la membrana de Matrigel y habían migrado a la superficie inferior de la membrana.

Estos datos muestran un efecto apoptótico del galato de epigallocatequina y la combinación de ácido ascórbico + prolina + lisina en A2058. A: células de melanoma humano en medio de cultivo tisular. B: células de melanoma humano en medio de cultivo tisular que contiene ácido ascórbico (100 μ M), prolina (140 μ M), lisina (400 μ M) y EGCG (20 μ g/ml). Nota; las células se destruyeron.

Ejemplo 5

Estudio de proliferación de células cancerosas

Células de melanoma A2058

La figura 5 muestra el efecto de 10, 20 y 50 μ g/ml de EGCG sin y con complemento de lisina, prolina y ácido ascórbico en la proliferación de células de melanoma. Ni la lisina, prolina y ácido ascórbico, ni el EGCG con 10 y 20 μ g/ml tenían un efecto significativo en la proliferación celular. Sin embargo, el EGCG con 50 μ g/ml reducía significativamente el número de células a 30%. Se observó un efecto similar con la lisina, prolina y ácido ascórbico.

Células de cáncer de mama MDA-MB-231

En estos experimentos, el medio base se complementó con EGCG 0, 10, 20, 50, 100 ó 200 μ g/ml (figura 6). Los resultados muestran que el complemento del medio base con EGCG 50, 100 y 200 μ g/ml reducía significativamente el número de células a $56,1 \pm 5,3$, $33,6 \pm 2$ y $29,6 \pm 0,8\%$ comparado con controles sin complementos respectivamente. Las concentraciones de EGCG en el medio celular de hasta 20 μ g/l no tienen ningún efecto inhibitor significativo en la proliferación celular.

También se estudiaron los efectos del ácido ascórbico, lisina, prolina y diferentes concentraciones de EGC en la proliferación de células cancerosas. La figura 7 muestra una reducción no significativa del número de células a $86,1 \pm 1,93\%$ con ácido ascórbico, lisina y prolina. Otras adiciones de 20, 50 y 100 μ g de EGCG a esta combinación reducían significativamente el número de células a $74 \pm 5,8$, $64,8 \pm 1,6$ y $22 \pm 5\%$ comparado con el grupo de control respectivamente.

Células de cáncer de colon HCT116

Aunque el efecto inhibitor del ácido ascórbico, prolina y lisina en la proliferación celular de células de cáncer de colon no era pronunciado, la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG 20 μ g/ml disminuía significativamente el número de células a $69 \pm 0,5\%$ (figura 8). Un nivel mayor de EGCG en esta combinación (50 μ g/ml) reducía drásticamente el número de células a $4,6 \pm 0,3\%$.

La actividad antiproliferativa de combinaciones de nutrientes usadas en estos estudios variaba con el tipo de células cancerosas. En las células de cáncer de mama, la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG tenía efectos antiproliferativos mayores que cuando estos nutrientes se usaban individualmente. En el melanoma y células de cáncer de colon la exposición a la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina no afectó a su proliferación. Sin embargo, la combinación de estos nutrientes con EGCG 20 μ g/ml daba como resultado una reducción significativa del número de células de cáncer de colon, pero no de las células de melanoma. Parecía que las células de cáncer de colon eran más sensibles que las células de cáncer de mama y las células de melanoma a la combinación de ácido ascórbico, prolina, lisina y EGCG. La proliferación de las células de cáncer de colon se reducía casi completamente (4,6%) cuando el ácido ascórbico, prolina y lisina se daban con EGCG 50 μ g/ml.

Ejemplo 6

Estudios de zimografía de gelatinasa

5 El efecto del EGCG en las células de melanoma con medio base y complemento de ácido ascórbico, prolina y lisina en la expresión de las MMP se representa en la figura 9 por zimografía de gelatinasa. Las células de melanoma mostraban dos bandas correspondientes a MMP-2 y MMP-9. La combinación de ácido ascórbico, lisina y prolina no tiene efecto en la expresión de las bandas de MMP comparado con el medio base. Sin embargo, el EGCG inhibe la expresión tanto de MMP-2 como de MMP-9 de una forma dependiente de la dosis. La intensidad de las bandas para el medio base y la combinación de ácido ascórbico, lisina y prolina era la misma.

Ejemplo 7

15 *Estudios de migración e invasión de la matriz extracelular*

Se examinaron los efectos inhibidores de una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina usada por separado y junto con diferentes concentraciones de EGCG. Se estudiaron los efectos de estas combinaciones en la matriz extracelular usando matrices de Matrigel preformadas, usadas habitualmente para evaluar el potencial invasivo de diferentes líneas celulares de cáncer.

Células de cáncer de mama MDA-MB-231

25 La figura 10 muestra los resultados de la invasión de Matrigel de las células de cáncer de mama incubadas en presencia de ácido ascórbico, prolina y lisina. La invasión de las células cancerosas incubadas en una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina se redujo a $48,1 \pm 22,1\%$ comparado con las células incubadas en medio sin complementar. En el medio complementado solo con $20 \mu\text{g/ml}$ de EGCG, el número de células invasoras disminuyó a $69,5 \pm 27,4\%$. La inhibición completa de la invasión de la matriz por las células de cáncer de mama se lograba en presencia de concentraciones de EGCG más altas ($50 \mu\text{g/ml}$ y $100 \mu\text{g/ml}$).

30 En otra serie de estudios, el complemento del medio con ácido ascórbico $100 \mu\text{M}$ redujo la invasión en 36%. El complemento de ácido ascórbico y prolina $140 \mu\text{M}$ reducía además la invasión en 47%. El uso de lisina $400 \mu\text{M}$ además de ácido ascórbico y prolina en el complemento redujo más la invasión a 67%; la lisina muestra una respuesta lineal en la potenciación de los efectos del ácido ascórbico y prolina hasta el nivel de $800 \mu\text{M}$.

35 La figura 10 también muestra que la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina, así como de $20 \mu\text{g/ml}$ de EGCG era eficaz para detener completamente la invasión de células de cáncer por la matriz extracelular. Esta combinación permite lograr el efecto inhibitor máximo en la invasión de las células de cáncer sin necesidad de usar concentraciones altas de nutrientes individuales. Así pues, el ácido ascórbico, prolina y lisina junto con EGCG permiten detener completamente la invasión de la matriz de las células de cáncer de mama con un nivel más bajo de EGCG ($20 \mu\text{g/ml}$).

Células de cáncer de colon HCT116

45 La figura 11 muestra que la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina reducía significativamente la invasión de células de cáncer de colon a $67,2 \pm 3,7\%$. El EGCG $20 \mu\text{g/ml}$ usado solo reducía la invasión a $44,9 \pm 3,3\%$, mientras que la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina y $20 \mu\text{g/ml}$ de EGCG tenía un efecto sinérgico en la reducción de la invasión de células de cáncer de colon a $24,9 \pm 4,6\%$.

50 *Células de melanoma A2058*

La figura 12 muestra que la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina era eficaz para reducir el número de células invasoras a $88,2 \pm 4\%$, sin embargo, esta disminución no era estadísticamente significativa. La combinación de estos nutrientes con tan poco como $20 \mu\text{g/ml}$ de EGCG era eficaz para reducir el número de células invasoras a cero.

55 Los resultados muestran que el uso de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG permite obtener una reducción drástica del número de células que invaden y migran por la membrana de Matrigel con niveles más bajos de EGCG. La invasión se redujo a cero usando un nivel tan bajo como $24 \mu\text{g/ml}$ de EGCG con ácido ascórbico, prolina y lisina en las células de cáncer de mama y células de melanoma. Los beneficios del resultado de la combinación no eran tan espectaculares con las células de cáncer de colon como los obtenidos con las células de cáncer de mama. El nivel de EGCG tenía que ser $50 \mu\text{g/ml}$ para obtener 90% de reducción en la invasión por estas células. En este estudio, no se observó alteración de la expresión de las MMP en las células de melanoma, aunque el EGCG tiene un efecto inhibitor en su expresión de una forma dependiente de la dosis.

65 Esta serie de estudios demuestran de forma concluyente que la presente formulación farmacéutica de nutrientes que comprende ácido ascórbico, prolina, lisina y al menos un compuesto polifenólico, ejerce un efecto antiproliferativo y efecto antiinvasivo eficaces en las células de cáncer.

ES 2 298 519 T3

Ejemplo 8

Se ilustran las preparaciones de las siguientes formulaciones farmacéuticas de nutrientes (Tablas 1-5) y de EPICAN FORTE™ (Tabla 6). Se encuentra que estas formulaciones que comprenden ácido ascórbico, prolina, lisina y al menos un compuesto polifenólico son eficaces para bloquear la invasión de células cancerígenas y metástasis de las células de cáncer.

TABLA 1

Formulación 1

Sustancias bioquímicas	Cantidad	%
Ácido ascórbico	250 mg	5,6
Ascorbato de calcio	250 mg	5,6
Ascorbato de magnesio	250 mg	5,6
Palmitato de ascorbilo	250 mg	5,6
Polifenoles	1.000 mg	22,5
N-Acetil-Cisteína	200 mg	4,5
Lisina	1.000 mg	22,5
Prolina	750 mg	16,8
Arginina	500 mg	11,2
Selenio	30 µg	<0,01
Cobre	2 mg	0,04
Manganeso	1 mg	0,02

mg = miligramos

µg = microgramos

"%" se refiere a % en peso del ingrediente individual frente al peso total de la formulación

ES 2 298 519 T3

TABLA 2
Formulación 2

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Sustancias bioquímicas	Cantidad	%
Ácido ascórbico	25 mg	5,7
Ascorbato de calcio	25 mg	5,7
Ascorbato de magnesio	25 mg	5,7
Palmitato de ascorbilo	25 mg	5,7
Polifenoles al 50%	200 mg	46,0
N-Acetil-Cisteína	10 mg	2,3
Lisina	50 mg	11,5
Prolina	25 mg	5,7
Arginina	50 mg	11,5
Selenio	1 µg	<0,001
Cobre	20 µg	<0,001
Manganeso	50 µg	<0,001

mg = miligramos
µg = microgramos

"%" se refiere a % en peso del ingrediente individual frente al peso total de la formulación

ES 2 298 519 T3

TABLA 3
Formulación 3

	Sustancias bioquímicas	Cantidad	%
5	Ácido ascórbico	5.000 mg	13,3
10	Ascorbato de calcio	5.000 mg	13,3
	Ascorbato de magnesio	5.000 mg	13,3
	Palmitato de ascorbilo	5.000 mg	13,3
15	Polifenoles al 100%	5.000 mg	13,3
	N-Acetil-Cisteína	1.500 mg	4,0
20	Lisina	5.000 mg	13,3
	Prolina	3.000 mg	8,0
	Arginina	3.000 mg	8,0
25	Selenio	200 µg	<0,001
	Cobre	9 mg	0,02
30	Manganeso	10 mg	0,002
	mg = miligramos		
	µg = microgramos		
35	"%" se refiere a % en peso del ingrediente individual frente al peso total de la formulación		

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 519 T3

TABLA 4
Formulación 4

5	Sustancias bioquímicas	Cantidad	%
	Ácido ascórbico	250 mg	4,7
10	Ascorbato de calcio	250 mg	4,7
	Ascorbato de magnesio	250 mg	4,7
	Palmitato de ascorbilo	250 mg	4,7
15	Polifenoles al 98%	1.000 mg	18,7
	N-Acetil-Cisteína	200 mg	3,7
20	Lisina	1.000 mg	18,7
	Prolina	750 mg	14,0
	Arginina	500 mg	9,3
25	Selenio	100 µg	<0,002
	Cobre	2 mg	0,04
30	Manganeso	1 mg	0,02
	Calcio	500 mg	9,3
	Magnesio	400 mg	7,5
35	mg = miligramos		
	µg = microgramos		
40	"%" se refiere a % en peso del ingrediente individual frente al peso total de la formulación		

45

50

55

60

65

ES 2 298 519 T3

TABLA 5
Formulación 5

	Sustancias bioquímicas	Cantidad	%
5	Ácido ascórbico	250 mg	4,5
10	Ascorbato de calcio	250 mg	4,5
	Ascorbato de magnesio	250 mg	4,5
15	Palmitato de ascorbilo	250 mg	4,5
	Polifenoles al 98%	1.000 mg	18
	N-Acetil-Cisteina	200 mg	3,6
20	Lisina	1.000 mg	18
	Prolina	750 mg	13,5
	Arginina	500 mg	9
25	Selenio	100 µg	<0,002
	Cobre	2 mg	<0,04
30	Manganeso	1 mg	<0,02
	Calcio	500 mg	9
	Magnesio	400 mg	7,2
35	Bioflavonoides cítricos	200 mg	3,6
	mg = miligramos		
40	µg = microgramos		
	"%" se refiere a % en peso del ingrediente individual frente al peso total de la formulación		

45

50

55

60

65

ES 2 298 519 T3

TABLA 6

Formulación para EPICAN FORTE™

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Tamaño de la porción: 6 cápsulas (uso sugerido: 2 cápsulas 3 veces al día preferiblemente con las comidas).		
6 Cápsulas contienen:	Cantidad por porción	% del valor diario
L-Lisina	1.000 mg	
L-Prolina	750 mg	
L-Arginina	500 mg	
Vitamina C (como ácido ascórbico, ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio y palmitato de ascorbilo)	782 mg	1180%
Calcio (del ascorbato de calcio)	22 mg	2%
Magnesio (del ascorbato de magnesio)	50 mg	12%
Extracto de té verde estándar (hoja) (polifenoles al 80% - 800 mg) descafeinado	1.000 mg	
N-Acetil-Cisteína	200 mg	
Selenio (de L-selenometionina)	30 mg	43%
Cobre (de glicinato de cobre)	2 mg	100%
Manganeso (de citrato de manganeso)	1 mg	50%
mg = miligramos		
µg = microgramos		
EPICAN FORTE™ es un nombre de marca registrada en una solicitud de patente pendiente de EE.UU.		
Otros ingredientes: Cápsulas vegetarianas (hidroxipropilmetilcelulosa), dióxido de silicio, celulosa y estearato de magnesio.		

Ejemplo 9

55

Efectos de EPICAN FORTE™ en células de cáncer humano

60

Se estudiaron los efectos de EPICAN FORTE™ en células de cáncer humano. Se estudiaron parámetros metastáticos tales como la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMP) por zimografía de gelatinasa, potencial de invasión por Matrigel y proliferación/crecimiento por ensayos de MTT. Los protocolos para estos ensayos son como se han descrito antes con detalle. Se usaron varias líneas celulares de cáncer humano: cáncer de piel - células de melanoma 2058, cáncer de hígado - células HepG2, fibrosarcoma - células HT 1080, cáncer de colon - HCT 116, cáncer de mama ER+/MCF-7 y cáncer de mama ER-/MDA-MB-231.

Las siguientes tablas (Tablas 7 y 8) resumen los resultados:

65

ES 2 298 519 T3

Efectos de EPICAN FORTE™ en la proliferación/crecimiento de líneas celulares de cáncer humano

TABLA 7

Dosis de tratamiento de EPICAN FORTE™ (µg/ml): Porcentaje de control

<u>Células de cáncer</u>	0	10	50	100	500	1000
Melanoma	100%	98	-	105	-	50
HepG2	100%	92	-	138	-	85
HT-1080	100%	100	-	97	80	63
Colon (HCT 116)	100%	119	125	141	120	106
MCF-7	100%	93	88	92	97	77
MDA-MB-231	100%	103	-	82	-	25

Efectos de EPICAN FORTE™ en la invasión de Matrigel y migración por células de cáncer humano

TABLA 8

Dosis de tratamiento de EPICAN FORTE™ (µg/ml): Porcentaje de control

<u>Células de cáncer</u>	0	10	50	100	500	1000
Melanoma	0%	80	98	100		-
HepG2	0%	15	25	50	95	100
HT-1080	0%	90	-	50	70	100
Colon (HCT 116)	0%	20	50	80	100	-
NMA-MB-231	0%	50	-	98	-	-
MCF-7				No invasivas		

Efectos de EPICAN FORTE™ en la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMP) por líneas celulares de cáncer humano

Células de melanoma: Las células de melanoma presentaban dos bandas en la zimografía de gelatinasa correspondientes a MMP-2 y MMP-9. EPICAN FORTE™ inhibía la expresión de MMP-2 y 9 de una forma dependiente de la dosis. La expresión de NEAP-2 y 9 se inhibía significativamente con una concentración de EPICAN FORTE™ de 100 µg/ml y era prácticamente indetectable con una concentración de 1000 µg/ml.

Células HepG2: Como las células de melanoma, las células HepG2 también expresaban dos bandas correspondientes a MMP-2 y MMP-9. EPICAN FORTE™ inhibía la expresión de MMP-2 y 9 con una concentración de 500 y 1000 µg/ml.

Fibrosarcoma HT-1080: Las células HT-1080 presentaban dos bandas para MMP-2 y 9. EPICAN FORTE™ también inhibía la expresión de ambas bandas de una forma dependiente de la dosis. Se observaron bandas muy débiles con una concentración de 500 y 1000 µg/ml.

Cáncer de colon HCT 116: Las células de cáncer de colon mostraban sólo una banda en la zimografía correspondiente a MMP-2, que desaparecía totalmente con una concentración de 100 µg/ml.

ES 2 298 519 T3

MCF-7 y MDA+MB-231: Estas líneas celulares de cáncer no expresaban ninguna banda de MMP en la concentración experimental de la invención, que era similar a la de las otras líneas celulares de cáncer.

La invasión de MDA-MH-231 a través de Matrigel se inhibió en 50, 60 y 95% con EPICAN FORTE™ 10, 50 y 100 µg/ml, respectivamente. EPICAN FORTE™ no era tóxico para MDA-MB-231 con 10 µg/ml y mostró una ligera toxicidad con 100 µg/ml. Sin embargo, presentaba una toxicidad significativa con 1000 µg/ml. No se expresaban ni MMP-2 ni MMP-9 por zimografía. A diferencia de esto, EPICAN FORTE™ no era tóxico para MCF-7 incluso con 500 µg/ml, y presentaba una ligera toxicidad con 1000 µg/ml. MCF-7 no era invasiva y no expresaba actividades de MMP.

EPICAN FORTE™ inhibía la expresión de MMP-2 y MMP-9 de una forma dependiente de la dosis. La expresión de MMP-2 y MMP-9 se inhibía significativamente con una concentración de EPICAN FORTE™ de 100 µg/ml y era prácticamente indetectable con una concentración de 100 µg/ml. EPICAN FORTE™ usado con concentraciones de 10 y 100 µg/ml no afectaba significativamente a la viabilidad de las células, y con 100 µg/ml mostraba citotoxicidad en el intervalo de 10-40 por ciento, dependiendo del tipo de célula. La invasión de las células de melanoma, células MDA-MB-231 y un cocultivo de células de melanoma con NHDF a través de Matrigel se reducía significativamente de una forma dependiente de la dosis. La invasión de células HT-1080 a través de Matrigel se inhibió en 10%, 50%, 70% y 100% con 10, 100, 200 y 1000 µg/ml, respectivamente. Es interesante que EPICAN FORTE™ no era tóxico para las células HT-1080 con 100 µg/ml. Estos resultados demuestran que EPICAN FORTE™ es muy eficaz para varias líneas celulares de cáncer y también en cocultivo. Estas observaciones ponen de manifiesto que EPICAN FORTE™ puede proporcionar una base terapéutica natural que lo convierte en un candidato valioso y prometedor para el tratamiento de cánceres humanos.

Ejemplo 10

Efectos de EPICAN FORTE™ en líneas de células humanas normales

Se estudiaron los efectos de EPICAN FORTE™ en células humanas normales. Se usaron parámetros similares a los de las líneas de células de cáncer; en concreto, expresión de MMP por zimografía, invasión a través de Matrigel y proliferación/crecimiento por ensayos de MTT. Se usaron varios fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), incluyendo: condrocitos humanos y células de estroma humano.

Las siguientes tablas (Tablas 9, 10 y 11) resumen los efectos de EPICAN FORTE™ en la proliferación/crecimiento, invasión y metástasis y producción de MMP en células humanas normales:

TABLA 9

Efectos de EPICAN FORTE™ en la proliferación/crecimiento de células humanas normales. Dosis de tratamiento de EPICAN FORTE™ (µg/ml): Porcentaje del control

Células normales	0	10	50	100	500	1000
NHDF	100%	118	-	135	-	90
Condrocitos	100%	113	-	148	76	82
Células de estroma	100%	100	116	115	98	64

TABLA 10

Efectos de EPICAN FORTE™ en la invasión de Matrigel por células humanas normales. Dosis de tratamiento de EPICAN FORTE™ (µg/ml): Porcentaje del control

Células normales	0	10	50	100	200	1000
NHDF	0%	67%	89%	100%	-	-
Condrocitos	0%	45%	85%	95%	100%	-
Células de estroma	0%	0%	-	95%	100%	-

ES 2 298 519 T3

Los efectos de EPICAN FORTE™ en la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMP) por células humanas normales se resumen como sigue:

5 *NHDF*: NHDF expresaba solo una banda por zimografía correspondiente a MMP-2, que prácticamente desaparecía con una concentración de EPICAN FORTE™ de 1000 µg/ml.

10 *Condrocitos*: Los condrocitos también mostraron solo una banda correspondiente a MMP-2. EPICAN FORTE™ inhibía la expresión de MMP-2 de una forma dependiente de la dosis. La expresión de MMP-2 se inhibía significativamente con una concentración de EPICAN FORTE™ de 100 µg/ml y desaparecía totalmente con una concentración de EPICAN FORTE™ de 200 µg/ml.

15 *Células de estroma*: Las células de estroma también presentaban solo una banda correspondiente a MMP-2. EPICAN FORTE™ inhibía la expresión de MMP-2 de una forma dependiente de la dosis. Se observaba una banda muy débil con una concentración de 50 y 100 µg/ml, que era indetectable con una concentración de 200 y 500 µg/ml.

20 En resumen, los resultados indicaban que EPICAN FORTE™ inhibe la expresión de MMP-2 de una forma dependiente de la dosis. La expresión de MMP-2 se inhibía significativamente con una concentración de EPICAN FORTE™ de 100 µg/ml y prácticamente no se detectaba con una concentración de 200 µg/ml. Además, también se encontró que la invasión de condrocitos a través de Matrigel se inhibía en 50%, 85% y 95% con 10 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml. Con 500 µg/ml la invasión se reducía totalmente a 0%.

25 EPICAN FORTE™ no era tóxico para los condrocitos incluso con una concentración de 200 µg/ml. De hecho, EPICAN FORTE™ ejercía un efecto de proliferación celular, un aumento de 70% en la proliferación celular con 200 µg/ml, 70% más frente al control. Se observó un ligero efecto tóxico sólo con 500 µg/ml. Estos resultados demuestran que EPICAN FORTE™ es eficaz para inhibir la expresión de MMP-2 y que EPICAN FORTE™ representa una nueva formulación de nutrientes antiinflamatoria como un procedimiento natural para inhibir la producción de MMP y la degradación de la matriz extracelular en la osteoartritis y otros trastornos relacionados incluyendo la excesiva degradación de cartílago.

30 Aunque se acaba de empezar a llevar a cabo ensayos *in vivo* de Epican-Forte, se han publicado dos casos que proporcionan la validez de Epican-Forte como medicamento para tratar el cáncer.

35 Una paciente mujer con tumor cerebral diagnosticado se trató con quimio y radioterapia sin éxito y a finales de abril de 2002 se desistió. Por suerte, se empezó a tratarla con Epican-Forte con las dosificaciones recomendadas. A finales de agosto de 2002, por MRT se mostró que el tumor había desaparecido.

40 Se diagnosticó a un paciente varón de 64 años que tenía un nivel muy elevado del marcador tumoral PSA en mayo de 2002 (59,9 µg/l), que tenía metástasis de carcinoma de próstata en los vasos linfáticos de la aorta. Empezó el tratamiento con Epican-Forte con la dosificación recomendada. Tres meses más tarde el nivel de PSA había bajado a 0,9 µg/l. El control por TC a finales de octubre de 2002 mostró que la metástasis linfática previamente visible ya no aparecía y su próstata tenía un tamaño normal.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de nutrientes que comprende:

5 - un compuesto ascórbico;

- un compuesto de L-lisina;

10 - un compuesto de L-prolina;

- al menos un compuesto polifenólico seleccionado del grupo que consiste en galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epicatequina y catequina; y

15 - N-acetil-cisteína.

2. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 1, en la que el compuesto ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, sales de ascorbato farmacéuticamente aceptables, ésteres de ascorbato y/o mezclas de los mismos.

20 3. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 2, en la que la sal de ascorbato farmacéuticamente aceptable es ascorbato de calcio o ascorbato de magnesio.

25 4. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 2 ó 3, en la que el éster de ascorbato es palmitato de ascorbilo.

5. La composición farmacéutica de nutrientes de una de las reivindicaciones precedentes, en la que el compuesto de lisina se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de lisina y sales de lisina farmacéuticamente aceptables.

30 6. La composición farmacéutica de nutrientes de una de las reivindicaciones precedentes, en la que el compuesto de prolina se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de prolina y sales de prolina farmacéuticamente aceptables.

35 7. La composición farmacéutica de nutrientes de una de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un oligoelemento seleccionado del grupo que consiste en selenio, cobre, manganeso, calcio y magnesio.

8. La composición farmacéutica de nutrientes de una de las reivindicaciones precedentes, que además comprende otro aminoácido adicional, en especial arginina.

40 9. Una composición farmacéutica de nutrientes que comprende: ácido ascórbico, ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, palmitato de ascorbilo, polifenoles, N-acetil-cisteína, L-lisina, L-prolina, L-arginina, selenio, cobre y manganeso.

10. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 9, en la que la composición comprende

45 a) 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 300 μ g de selenio, 2 mg de cobre y 1 mg de manganeso.

50 b) 25 mg de ácido ascórbico, 25 mg de ascorbato de calcio, 25 mg de ascorbato de magnesio, 25 mg de palmitato de ascorbilo, 200 mg de polifenoles, 10 mg de N-acetil-cisteína, 50 mg de lisina, 25 mg de prolina, 50 mg de arginina, 1 mg de selenio, 2 μ g de cobre y 50 μ g de manganeso.

55 c) 5.000 mg de ácido ascórbico, 5.000 mg de ascorbato de calcio, 5.000 mg de ascorbato de magnesio, 5.000 mg de palmitato de ascorbilo, 5.000 mg de polifenoles, 1.500 mg de N-acetil-cisteína, 5.000 mg de lisina, 3.000 mg de prolina, 3.000 mg de arginina, 200 μ g de selenio, 9 mg de cobre y 10 mg de manganeso.

60 d) 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 250 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 100 μ g de selenio, 2 mg de cobre, 1 mg de manganeso, 500 mg de calcio y 400 mg de magnesio.

65 e) 250 mg de ácido ascórbico, 250 mg de ascorbato de calcio, 250 mg de ascorbato de magnesio, 250 mg de palmitato de ascorbilo, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 1.000 mg de lisina, 750 mg de prolina, 500 mg de arginina, 100 μ g de selenio, 2 mg de cobre, 1 mg de manganeso, 500 mg de calcio, 400 mg de magnesio y 200 mg de bioflavonoides cítricos.

11. Una composición farmacéutica de nutrientes que comprende: L-lisina, L-prolina, L-arginina, un compuesto ascórbico, calcio, magnesio, polifenoles, N-acetil-cisteína, selenio, cobre y manganeso.

ES 2 298 519 T3

12. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 11, en la que la composición comprende 1.000 mg de L-lisina, 750 mg de L-prolina, 500 mg de L-arginina, 710 mg de ácido ascórbico, 22 mg de calcio, 50 mg de magnesio, 1.000 mg de polifenoles, 200 mg de N-acetil-cisteína, 30 μ g de selenio, 2 mg de cobre y 1 mg de manganeso.

5 13. La composición farmacéutica de nutrientes de la reivindicación 11 ó 12, en la que el compuesto ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio y palmitato de ascorbilo.

10 14. La composición farmacéutica de nutrientes de una de las reivindicaciones 11 a 13, en la que los polifenoles se seleccionan del grupo que consiste en galato de epigalocatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, epicatequina, catequina y otras sales de polifenoles farmacéuticamente aceptables y/o mezclas de los mismos.

15 15. Uso de una composición de nutrientes como se especifica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para preparar una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

16. El uso de la reivindicación 15, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer cerebral.

20 17. Uso de una composición de nutrientes como se especifica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad inflamatoria.

18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicha enfermedad inflamatoria es la osteoartritis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

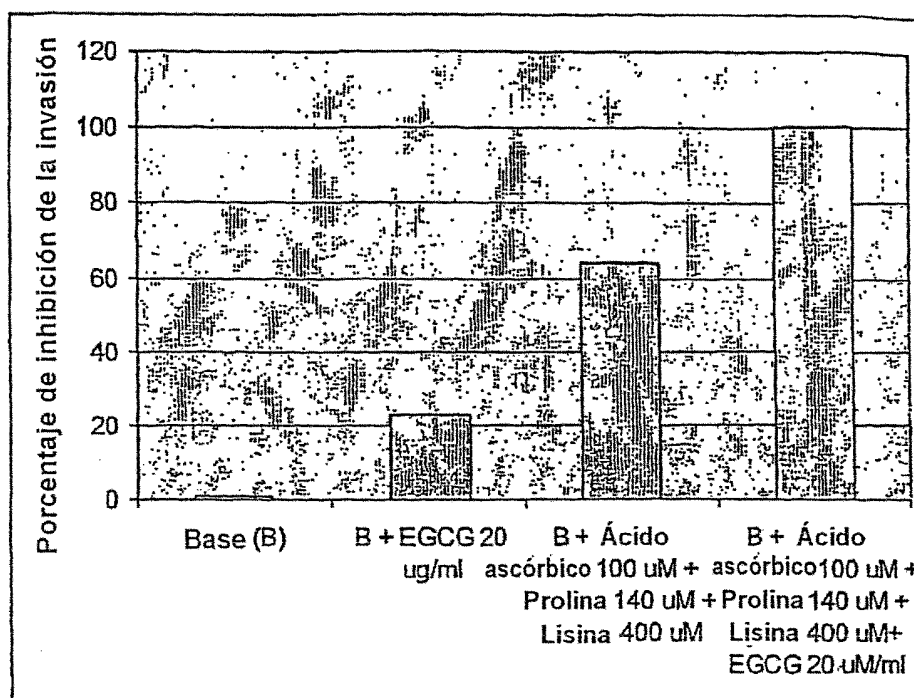


FIGURA 1

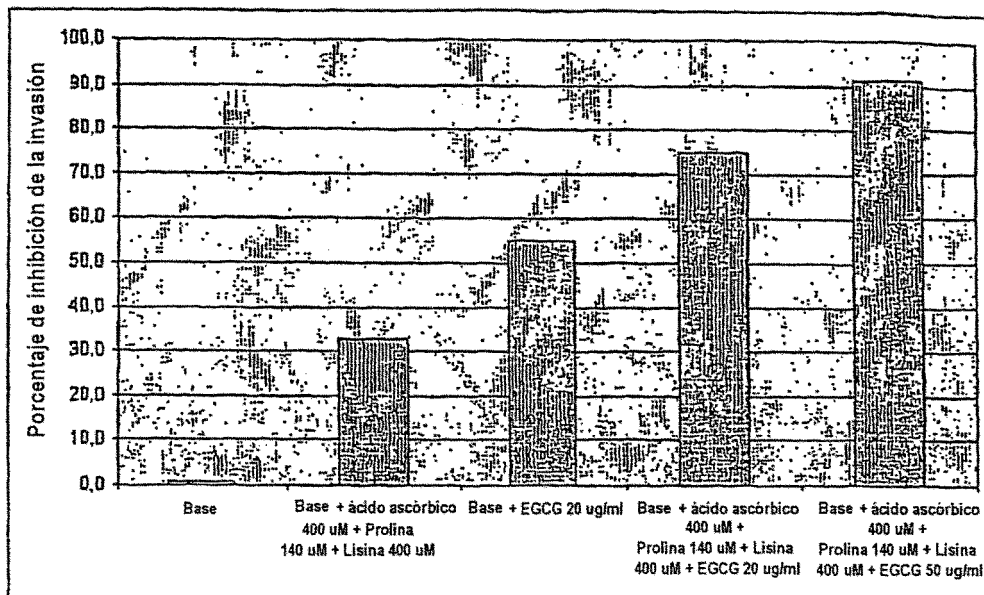


FIGURA 2

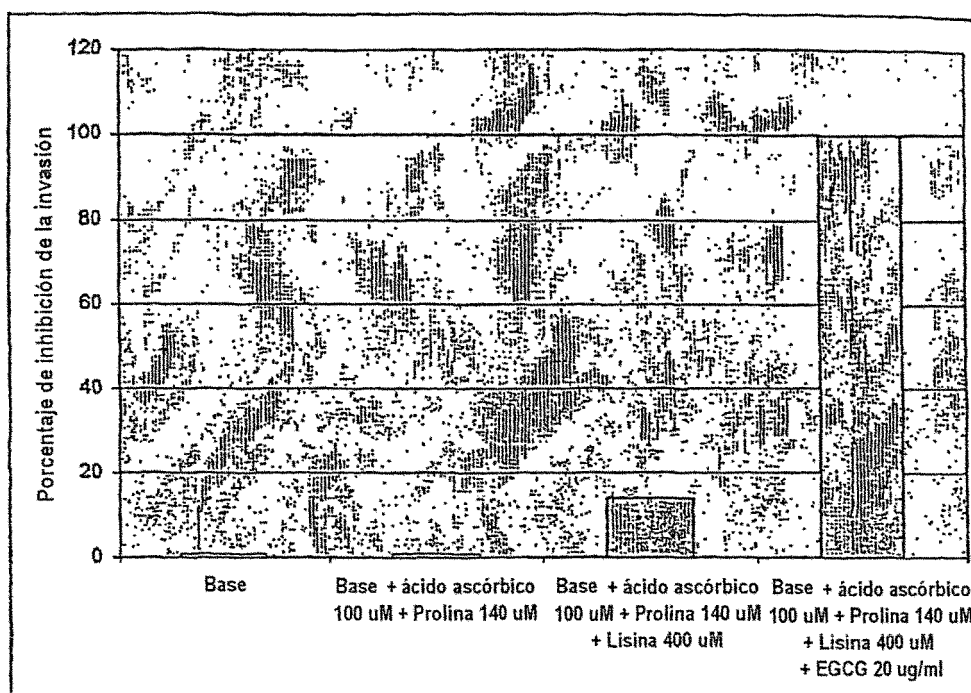
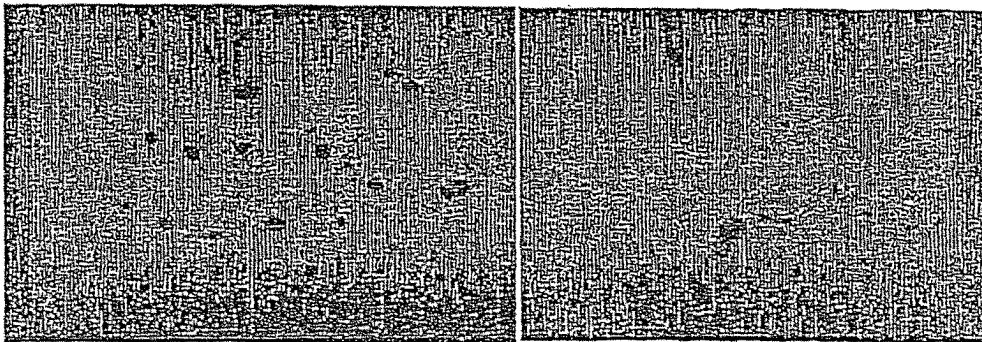


FIGURA 3



A

B

FIGURA 4

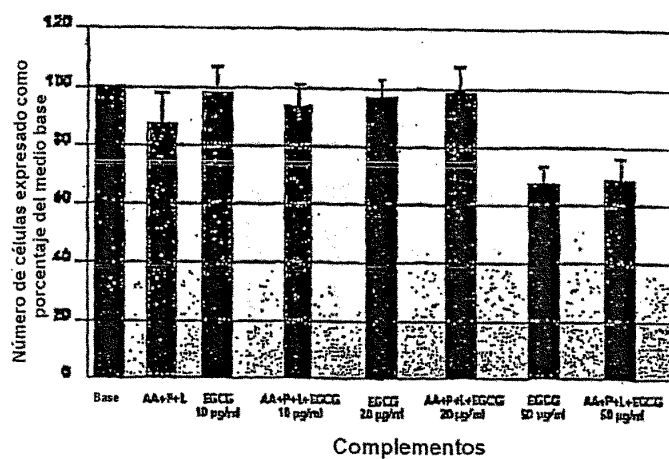


Figura 5

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 μ M, prolina (P) 140 μ M, lisina (L) 400 μ M y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la proliferación de células de melanoma A2058.

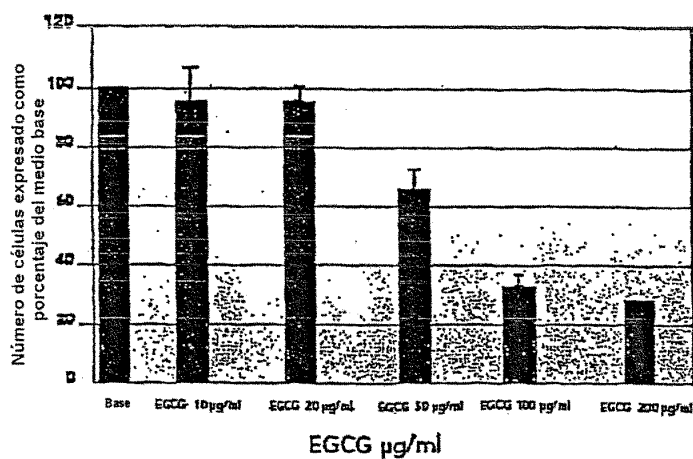


Figura 6

Efecto del galato de epigalocatequina (EGCG) en la proliferación celular de células de cáncer de mama MDA-MB 231.

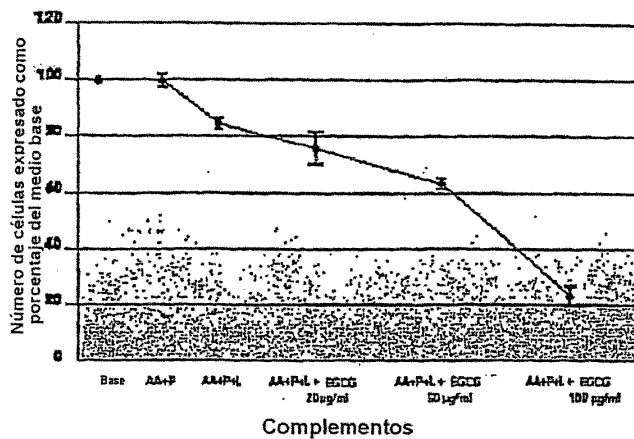


Figura 7

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 μ M, prolina (P) 140 μ M, lisina (L) 400 μ M y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB 231.

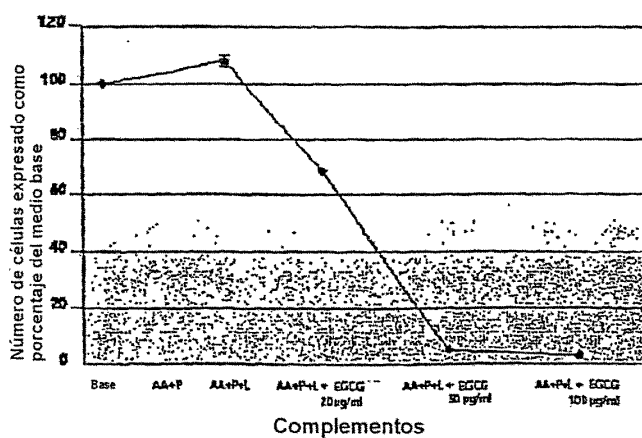


Figura 8

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 μ M, prolina (P) 140 μ M, lisina (L) 400 μ M y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la proliferación celular de células de cáncer de colon HCT116.

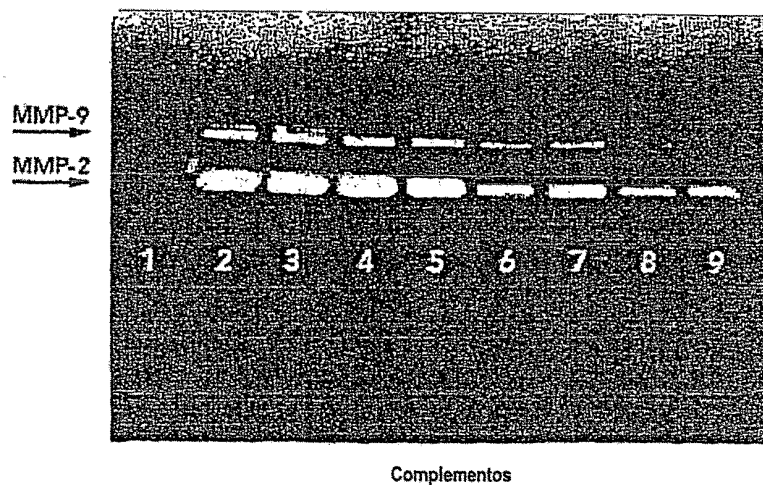


Figura 9

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 µM, prolina (P) 140 µM, lisina (L) 400 µM y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMP) por células de melanoma.

1. Marcadores; 2. Medio base; 3 AA+P+L; 4. EGCG 10 µg/ml; 5. AA+P+L+ EGCG 10 µg/ml; 6. EGCG 20 µg/ml; 7. AA+P+L+EGCG 20 µg/ml; 8. EGCG 50 µg/ml; 9. AA+P+L+EGCG 50 µg/ml

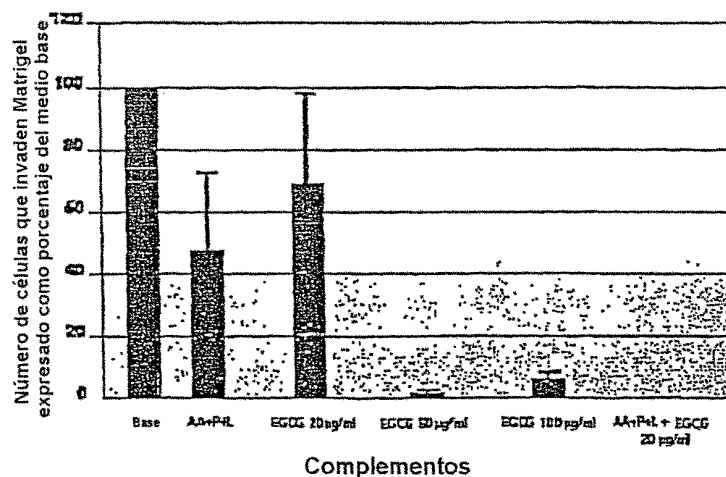


Figura 10

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 µM, prolina (P) 140 µM, lisina (L) 400 µM y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la invasión de Matrigel por células de cáncer de mama MDA-MB 231.

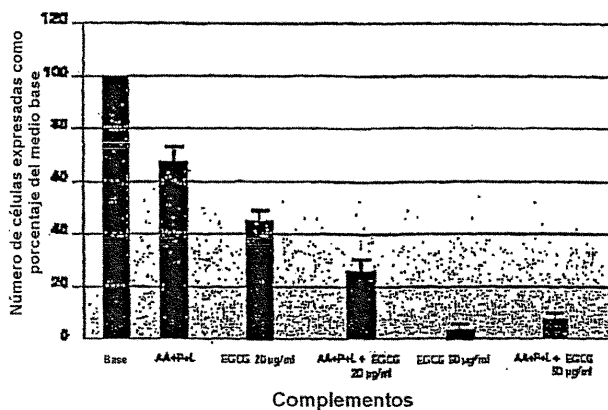


Figura 11

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 μ M, prolina (P) 140 μ M, lisina (L) 400 μ M y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en la invasión de Matrigel por células de cáncer de colon HCT116.

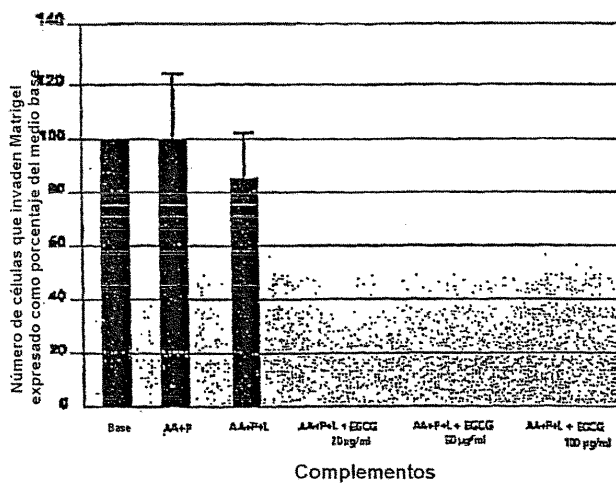


Figura 12

Efecto de complementar el medio base con ácido ascórbico (AA) 100 μ M, prolina (P) 140 μ M, lisina (L) 400 μ M y diferentes niveles de galato de epigalocatequina (EGCG) en Matrigel.



Figura 13. Representa un barrido de TC

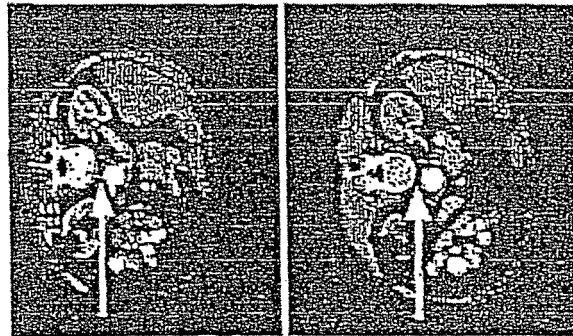


Figura 14. Representa un barrido de TC