



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 126**

51 Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02712877 .6**

96 Fecha de presentación : **31.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1463498**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54

Título: **Composición farmacéutica que comprende una catequina, ácido ascórbico, prolina y lisina para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.**

30

Prioridad: **08.01.2002 US 41427**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.01.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.01.2010

73

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

72

Inventor/es: **Rath, Matthias;
Netke, Shirang;
Ivanov, Vadim;
Roomi, Waheed y
Niedzwiecki, Aleksandra**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 332 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende una catequina, ácido ascórbico, prolina y lisina para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

5 La presente invención se refiere al uso de un compuesto de catequina seleccionado de epicatequinas, epigalocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina en combinación con ácido ascórbico, lisina y prolina para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

10 Los compuestos polifenólicos, también conocidos como catequinas, están presentes en el té verde y se ha sugerido que proporcionan protección frente a diversas enfermedades incluido el cáncer (Mukhtar H., Ahmed N. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1698S-1702S (2000)). Sadzuka *et al.* mostraron que la administración por vía oral de té verde realizaba los efectos de la doxorubicina de inhibir el tumor en los ratones.

15 La actividad anti-cáncer de las catequinas puede relacionarse con sus efectos en varios factores involucrados en la proliferación de células cancerosas y su metástasis. Se demuestra que las catequinas causan una parada del ciclo celular en las células de carcinoma humano (Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Mukhtar H.J. *Natl. Cancer Inst.* 89: 1881-1886 (1997)). Se demuestra que la fracción polifenólica del té verde protege contra la inflamación y las citoquinas inducidas por los tumores.

20 Los compuestos polifenólicos están presentes en un 30% del peso seco en el té verde. Incluyen flavanoles, flavandioles, flavonoides y ácidos fenólicos. Los flavanoles son los más abundantes entre los polifenoles en el té verde y se conocen comúnmente como catequinas. Hay cuatro catequinas principales en el té verde: 1) (-)-epicatequina, 2) (-)-epitecatequina-3-galato, 3) (-)-epigalocatequina y 4) (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG). Entre las catequinas, el EGCG es el principal constituyente polifenólico presente en el té verde.

25 El EGCG es un potente compuesto antioxidante (*J. Cell. Biochem.* 265: 236-257 (1996)) y puede atribuirse a la actividad antitumoral del té verde. Se informó que los compuestos de catequina ejercen su actividad antimetastásica impidiendo el proceso de angiogénesis (Cao Y., Cao R. *Nature* 398:381 (1999)). También se ha demostrado que el EGCG interfiere en la actividad de la uroquinasa (activador u-plasminógeno), una de las enzimas más frecuentemente expresadas en los cánceres humanos (Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak J.E. *Nature*: 387-567 (1997)).

30 Sin embargo, se establece que la biodisponibilidad de polifenoles en los humanos es extremadamente baja (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)). La baja concentración de tejido reduce ampliamente el valor terapéutico de los polifenoles incluido el EGCG. Hay una constante necesidad de encontrar una mejor composición que contenga polifenoles que sea eficaz en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas. Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado una composición que comprende catequinas, ácido ascórbico, prolina y lisina que pueden ejercer una potente actividad antiproliferativa y antimetastásica frente a las enfermedades neoplásicas.

35 La presente invención se refiere a un uso de una composición de sustancias bioquímicas que comprende una catequina, ácido ascórbico, prolina y lisina que son eficaces en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas.

40 La presente invención se refiere a un uso de una composición de sustancias bioquímicas que comprende una catequina, ácido ascórbico, prolina y lisina que son eficaces en inhibir una metaloproteinasa de la matriz.

45 La presente invención se refiere a un uso de una composición que comprende un compuesto de catequina, ácido ascórbico, prolina y lisina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neoplásicas relacionadas con la excesiva degradación de la matriz extracelular.

50 La Fig. 1 representa los efectos inhibidores del EGCG sobre la proliferación celular de células de cáncer de mama (MDA-MB 231).

55 La Fig. 2 representa los efectos inhibidores sinérgicos de la combinación del EGCG, ácido ascórbico, prolina y lisina sobre la proliferación celular de las células de cáncer de mama (MDA-MB 231).

60 La Fig. 3 representa los efectos inhibidores sinérgicos de la combinación del EGCG, ácido ascórbico, prolina y lisina sobre la proliferación celular de células de cáncer de colon (HCT116).

65 La Fig. 4 representa que el EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$) inhibe la invasión de Matrigel por las células de cáncer de mama en aproximadamente un 25%. Una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina inhibe aproximadamente el 65%. Una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$) inhibe completamente (aproximadamente 100%) la invasión de Matrigel.

ES 2 332 126 T3

La Fig. 5 representa que la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibe sinérgicamente el uso al 100% de la invasión de Matrigel por las células de melanoma (A2058).

5 La Fig. 6 representa un zimograma que muestra que el EGCG disminuye la actividad de la MMP2 secretada por las células del cáncer de mama.

La Fig. 7 representa la morfología normal de las células de melanoma después de un ensayo de invasión de Matrigel.

10 La Fig. 8 representa los cambios inducidos por la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina en la morfología de las células de melanoma.

La Fig. 9 representa los efectos apoptóticos de la combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG.

15 En otra realización, la presente invención se refiere a un uso de una composición que comprende catequinas presentes en los extractos del té y del vino tinto en combinación con otros constituyentes dietéticos, para efectos sinérgicos, frente a las enfermedades neoplásicas. Los constituyentes dietéticos cubiertos por esta aplicación incluyen, pero no se limitan a los detallados en esta solicitud.

20 Los compuestos de catequina pueden usarse en combinación con vitamina E, glutatión, con otros flavinoides, con agentes facilitadores como ácido fólico y con metales como selenio que se conocen por modificar adecuadamente la actividad de metaloproteinasas de la matriz, permitiéndonos reducir la concentración eficaz a la que el EGCG puede manifestar su actividad anti-tumoral.

25 En otra realización, la presente invención se refiere a un uso de la composición que comprende catequinas que es eficaz en reducir la transformación de células corporales normales en células cancerosas.

30 En otra realización, la presente invención se refiere a un uso de la composición que comprende catequinas que es eficaz en prevenir la proliferación celular de células cancerosas y en reducir la síntesis, secreción y/o actividad de varias metaloproteinasas de la matriz que digieren la matriz-extracelular (ECM).

35 En otra realización, la presente invención se refiere a la prevención y tratamiento de estados neoplásicos en los que la composición que comprende catequinas, ácido ascórbico, prolina y lisina puede ser administrada por vía oral o por uso tópico.

La presente invención se describe en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Condiciones Generales Experimentales

40 (a) *Estirpes de Células*

En los estudios se usaron las siguientes estirpes de células de cáncer obtenidas a partir de ATCC:

45 (i) Células MDA-MB 231 de cáncer de mama humano

(ii) Células HCT 116 de cáncer de colon humano

(iii) Células A 2058 de melanoma humano

50 (b) *Estudios de la Proliferación Celular*

55 Para estudiar los efectos de catequinas y composiciones dietéticas sobre la proliferación celular de las células de cáncer humano, se cultivaron varias estirpes de células de cáncer humano en placas de 24 pocillos usando las condiciones de cultivo especificadas por ATCC (suministrador de estirpes de células). Las células se incubaron generalmente de 3 a 4 días (antes de que se alcanzara la coalescencia). El número total de células en un pocillo de cultivo se determinó tiñendo las células con tinte vital (MTT) seguido de la determinación de la OD de la solución de tinción. El MTT sólo tiñe las células muertas y la cantidad de absorción del tinte se correlaciona con el número de células muertas en el cultivo. El porcentaje de inhibición se calculó comparando la OD de los grupos de tratamiento con la OD de los grupos de referencia.

(c) *Estudios de la Invasión del Matrigel*

65 Los estudios de la Invasión del Matrigel se llevaron a cabo usando insertos de Matrigel (Becton Dickinson) en placas compatibles de 24 pocillos. Este ensayo es un ensayo fiable para evaluar la metástasis del cáncer.

ES 2 332 126 T3

Las células de fibroblasto humano se sembraron y se dejaron crecer en las placas de 24 pocillos usando un medio de cultivo que contenía ~10% de suero. Cuando los fibroblastos alcanzaron la coalescencia, el medio de cultivo con suero se retiró y se sustituyó con medio de cultivo de nueva aportación sin el suero. Al medio de cultivo sin suero se añadió una combinación de compuestos de catequina mas la composición dietética y las células de cáncer humano se sembraron en la superficie superior de los insertos del Matrigel.

Después de 18 horas, los medios de cultivo se retiraron. Algunos medios de cultivo se guardaron para estudios de zimograma. Las células sobre la superficie superior de los insertos se quitaron restregando suavemente con una escobilla de algodón. Las células que habían penetrado la membrana de Matrigel y que habían migrado a la superficie superior de Matrigel se tiñeron con Quick Stain y se contaron bajo el microscopio.

(d) Estudios de Zimograma

El medio de cultivo (25-30 μ l) de los estudios de Invasión de Matrigel se aplicó a geles para zimograma Novex (Invitrogen). Las placas de gel se desarrollaron y se tiñeron como recomienda el fabricante. Las bandas de metaloproteinasas de la matriz (MMP) se identificaron en base a sus pesos moleculares conocidos.

(e) Estudios Morfológicos

La morfología de las células de cáncer humano que habían migrado a la superficie inferior de la membrana de Matrigel se tiñó con Tinte Rápido (Quick Stain) y se fotografiaron bajo el microscopio (100X).

Ejemplo 1

Efectos Inhibidores del Galato de Epigallocatequina (EGCG) sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Mama Humano (MDA MB 231)

En estos estudios, 5×10^4 células de cáncer de mama (MDAMB 231) se sembraron en cada uno de los pocillos de la placa de 24 pocillos. El grupo de referencia se refiere a células de cáncer de mama que se desarrollaron en medio de cultivo Liebovitz suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). El grupo se tratamiento se refiere a células de cáncer de mama que se dejaron para que se desarrollaran en medio de cultivo Liebovitz suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) más 0, 10, 20, 50, 100 ó 200 mg/ml de EGCG. Las placas se incubaron al aire del ambiente (sin CO₂ suplementario) durante un periodo de 4 días.

Al final del período, el medio de cultivo se retiró y las células en cada pocillo se tiñeron con la MTT. El exceso de tinte de MTT se retiró mediante lavado. Las células de cáncer teñidas con MTT se disolvieron en 1 ml de solución DMSO. La densidad óptica (OD) de la solución se determinó para cada pocillo. La OD del pocillo era directamente proporcional al número de células muertas. La OD de las células de cáncer teñidas con MTT, que se cultivaron previamente en ausencia de EGCG, se usó como referencia y se consideró como 100. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula: % de Inhibición = (OD de Referencia - OD del Tratamiento de Ensayo)/OD de Referencia X 100%.

El EGCG a 20, 50, 100 y 200 μ g/ml provocó, respectivamente, un inhibición de 3, 34, 66 y 70% de la proliferación celular de células de cáncer humano (Fig. 1). El EGCG a 10 μ g/ml no inhibía la proliferación celular.

Ejemplo 2

Efecto Inhibidor de una Combinación de Ácido Ascórbico, Prolina y Lisina con Varias Concentraciones de EGCG sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Mama Humano (MDA MB 231)

El procedimiento general de estos estudios permanece siendo el mismo que en el Ejemplo 1.

En estos estudios, el medio de cultivo basal se suplementó con lo siguiente:

- i) ácido ascórbico (100 μ M) + prolina (140 μ M);
- ii) ácido ascórbico (100 μ M) + prolina (140 μ M) + Lisina (400 μ M);
- iii) ácido ascórbico (100 μ M) + prolina (140 μ M) + Lisina (400 μ M) más 20 mg/ml de EGCG;
- iv) ácido ascórbico (100 μ M) + prolina (140 μ M) + Lisina (400 μ M) más 50 mg/ml de EGCG; o
- v) ácido ascórbico (100 μ M) + prolina (140 μ M) + Lisina (400 μ M) más 100 mg/ml de EGCG.

ES 2 332 126 T3

El ácido ascórbico + prolina no causó ninguna inhibición de la proliferación celular. El ácido ascórbico + prolina + lisina inhibía la proliferación celular en aproximadamente un 14% (Fig. 2). Una combinación de ácido ascórbico + prolina + lisina más 20 µg/ml de EGCG causó una inhibición del 20% (Fig. 2). 20 µg/ml de EGCG solo causó sólo una inhibición del 3% (Ejemplo 1). Así, una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina actúa sinérgicamente con EGCG para inhibir la proliferación de las células cancerosas.

Ejemplo 3

Efectos Inhibitorios de una Combinación de Ácido Ascórbico, Prolina y Lisina con Varios Niveles de EGCG sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Colon Humanas (HCT116)

En este estudio, las células de cáncer de colon humano se desarrollaron en medio de cultivo 5A de McCoy con 10% de suero fetal bovino en atmósfera al 5% en CO₂. El procedimiento general y el tratamiento investigados fueron los mismos que se usaron en el Ejemplo 2.

Una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina con EGCG incrementó sinérgicamente los efectos inhibidores sobre la proliferación celular desde 0% a 31% a 20 µg/ml de EGCG y hasta aproximadamente 95% a 50 µg/ml de EGCG (Fig. 3).

Efectos inhibidores de EGCG y una combinación de ácido ascórbico, prolina y lisina sobre la invasión de matrigel por células cancerosas

Ejemplo 4

Efectos Inhibidores de Niveles Escalonados de EGCG y Combinación de Ácido Ascórbico, Prolina y Lisina con Varios Niveles de EGCG sobre la Invasión a Través de Matrigel por Células de Cáncer de Mama (MDA MB 231)

El procedimiento general del ensayo de la Invasión de Matrigel se ha descrito anteriormente. En este ensayo, las células de cáncer de mama humano (5 x 10⁴) se sembraron en cada inserto. Varios suplementos se añadieron al medio de cultivo Leibovitz. Las placas se incubaron en un incubador al aire del ambiente sin CO₂ suplementario.

Una composición que comprende de 20 a 50 µg/ml de EGCG en el medio de cultivo inhibió la invasión por células de cáncer de mama en aproximadamente un 26% y un 100%, respectivamente. Mientras el ácido ascórbico (100 µM) + prolina (140 µM) + lisina (400 µM) en el medio de cultivo causó un 65% de inhibición, una combinación de ácido ascórbico (100 µM) + prolina (140 µM) + lisina (400 µM) más 20 µg/ml de EGCG inhibía completamente (inhibición del 100%) la invasión por células cancerosas (Fig. 4).

Ejemplo 5

Efectos Inhibidores de Niveles Escalonados de EGCG y combinación de Ácido Ascórbico, Prolina y Lisina con Varios Niveles de EGCG sobre la Invasión a Través de Matrigel de Células de Melanoma Humano (A2058)

El procedimiento general para el ensayo de Invasión de Matrigel se ha descrito anteriormente. Las células de melanoma humano (A2058) (5 x 10⁴) se sembraron en cada inserto. Varios suplementos se añadieron a DMEM. Las placas se incubaron en un incubador en una atmósfera al 5% de CO₂.

Mientras una combinación de ácido ascórbico (100 µM) + prolina (140 µM) + Lisina (400 µM) causaba sólo 13% de inhibición, una combinación de ácido ascórbico (100 µM) + prolina (140 µM) + Lisina (400 µM) mas 20 µg/ml de EGCG impedía completamente la invasión de células de melanoma a través del Matrigel (Fig. 5).

Estudios de zimogramas

Ejemplo 6

Efectos de Niveles Escalonados de EGCG sobre la Producción de MMP2 de Células de Cáncer de Mama Humano (MDA MB 231)

Los medios de cultivo de varios tratamientos en el ensayo de invasión de Matrigel (Ejemplo 4) se aplicaron a gel para zimogramas Novex (Invitrogen). Las placas se desarrollaron y se tiñeron según se recomienda por el fabricante. Las bandas de matrix-metaloproteinasas (MMP) se identificaron en base a sus pesos moleculares conocidos (Fig. 6).

El zimograma del medio de cultivo de los ensayos de la invasión del Matrigel indicó que 20 µg/ml de EGCG en el medio de cultivo reducían la producción de MMP2 e inhibían completamente la producción de MMP9 (Fig. 6). A concentraciones de 50 µg/ml y 100 µg/ml de EGCG, las actividades tanto de MMP2 como de MMP9 se inhibieron completamente (Fig. 6).

Morfología celular

Ejemplo 7

5 *Efectos de EGCG y una Combinación de Ácido Ascórbico, Prolina y Lisina sobre la Morfología Celular de Células de Melanoma Humano (A2058)*

Las micrografías de las células cancerosas en medio de cultivo basal a medida que migran a través del Matrigel se mostraron en la Fig. 7. La inclusión de la combinación de ácido ascórbico (100 μM) + prolina (140 μM) + lisina (400 μM) en el medio de cultivo alteró la morfología de las células (Fig. 8). La distensión de las células, con distintos alargamientos del núcleo, fue evidente. La adición de 20 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG a la combinación de ácido ascórbico (100 μM) + prolina (140 μM) + lisina (400 μM) en el medio de cultivo causó cambios apoptóticos extensivos (Fig. 9).

Estos descubrimientos descritos en los Ejemplos 1-7 indicaron que el EGCG ejercía un fuerte efecto sinérgico cuando el EGCG se usaba con una combinación de ácido ascórbico + prolina + lisina. Por lo tanto, estos estudios mostraban un efecto sinérgico sorprendente de una combinación de EGCG y ácido ascórbico + prolina + lisina haciéndole posible tomar una total ventaja de la actividad anti-proliferativa y anti-metastásica de EGCG a niveles comparativamente bajos de su concentración en el tejido.

Por consiguiente, los actuales descubrimientos tienen una inmensa importancia ya que pueden llevar a un nivel eficaz de catequinas cercano a los que pueden lograrse en los tejidos.

Se ha sugerido que la proliferación de células cancerosas y la regulación por incremento de sus enzimas están causadas por una concentración incrementada de especies de oxígeno reactivo (ROS). En esta situación, el uso de combinaciones de varios antioxidantes biológicos tales como los tocoferoles, carotinoides junto con otros agentes facilitadores como ubiquinoles, bioflavonoides, ácido lipoico, carnitina, proporcionarán una mezcla sinérgica más potente para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas.

La presente invención proporciona la observación sorprendente de que una combinación que comprende compuestos de catequina con ácido ascórbico, prolina y lisina ejercería una actividad sinérgica y de este modo haría posible lograr una actividad anti-cáncer muy eficaz a niveles inferiores de las catequinas de los tejidos. Los anteriores descubrimientos abren la posibilidad de usar esta combinación a niveles eficaces para la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Un especialista en la técnica comprenderá que prolina y lisina no se limitan solamente a prolina y lisina. Se entiende que el alcance de la presente invención abarca los derivados de lisina y sus precursores, los derivados de prolina y sus precursores.

Un especialista en la técnica comprenderá que el anti-oxidante, el ácido ascórbico, debería abarcar los derivados y precursores del ácido ascórbico.

Otros antioxidantes biológicos incluyen tocoferoles y compuestos relacionados, ácido transretinoico y compuestos relacionados, carotinoides y compuestos relacionados, glutatión y compuestos relacionados, ubiquinoles y compuestos relacionados, folatos y compuestos relacionados, bioflavonoides y compuestos relacionados así como compuestos de selenio.

Aplicaciones Clínicas

La invención se concentra sobre el uso preventivo y terapéutico de una catequina en combinación con ácido ascórbico, prolina y lisina. El uso combinado de una catequina con ácido ascórbico, prolina y lisina incrementa la eficacia del compuesto de catequina en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso de

5

- un compuesto de catequina seleccionado del grupo constituido por epicatequinas, epigalocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina,

- ácido ascórbico,

10

- prolina y

- lisina

15

para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades neoplásicas.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende adicionalmente un ácido fólico.

20

3. El uso de la reivindicación 2, en el que el ácido fólico es folato.

4. El uso de una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición comprende adicionalmente selenio.

25

5. El uso de la reivindicación 4, en el que el selenio se selecciona del grupo constituido por selenita y seleniato de metilo.

30

35

40

45

50

55

60

65

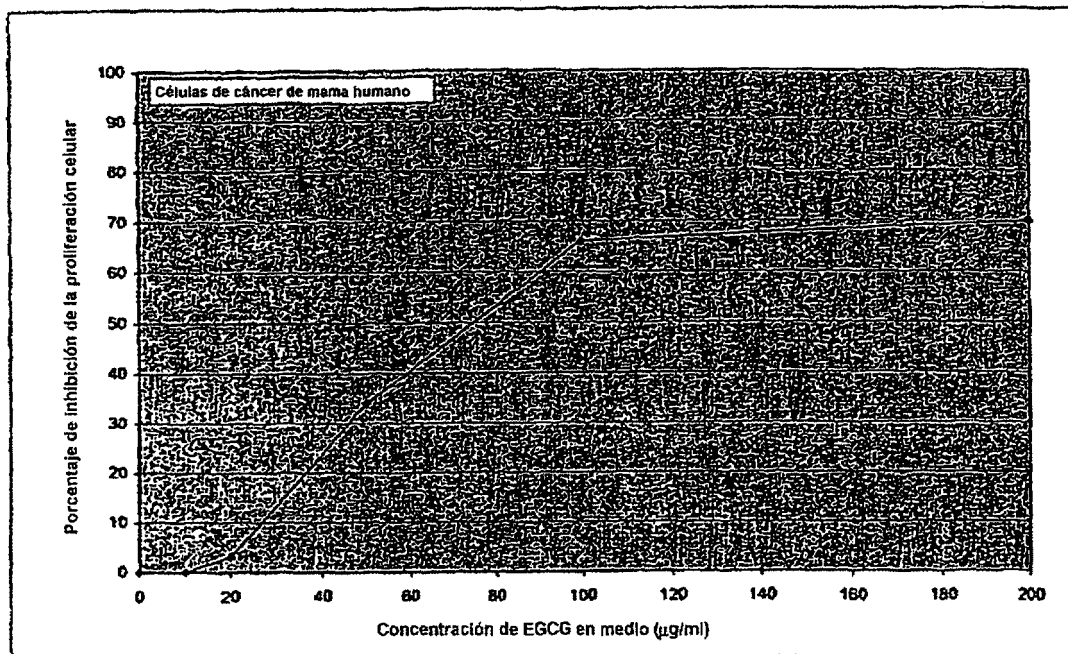


Figura 1. Efectos inhibidores de - Varias Concentraciones de Gelato de Epigallocatequina (EGCG) sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Mama Humano

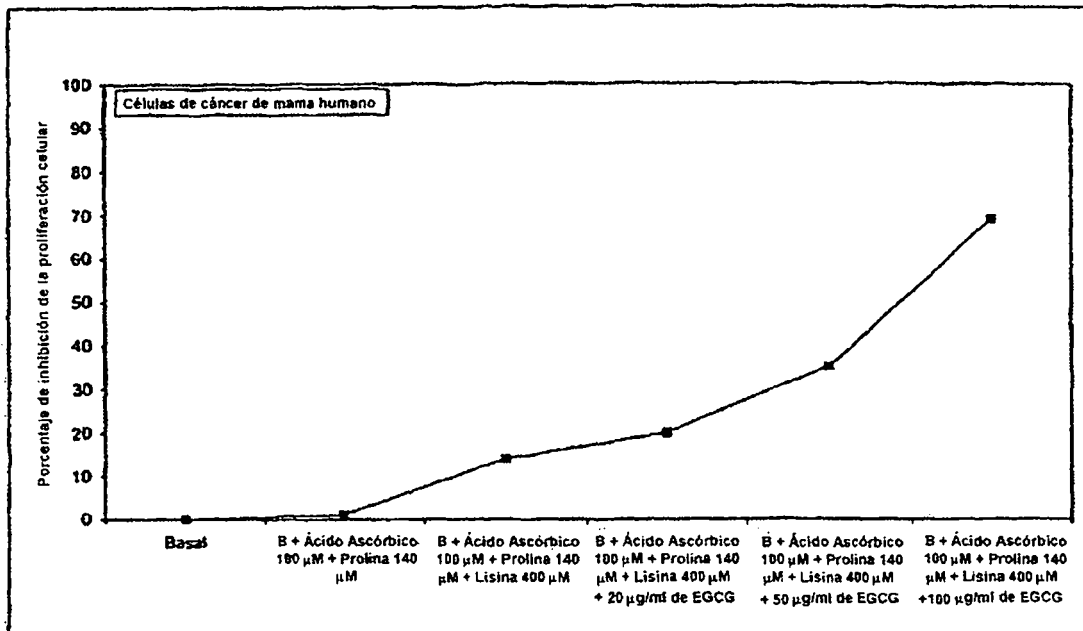


Figura 2. Efectos inhibidores de Ácido Ascórbico + Prolina; Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina; Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina + Varias Concentraciones de Galato de Epigallocatequina (EGCG) sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Mama

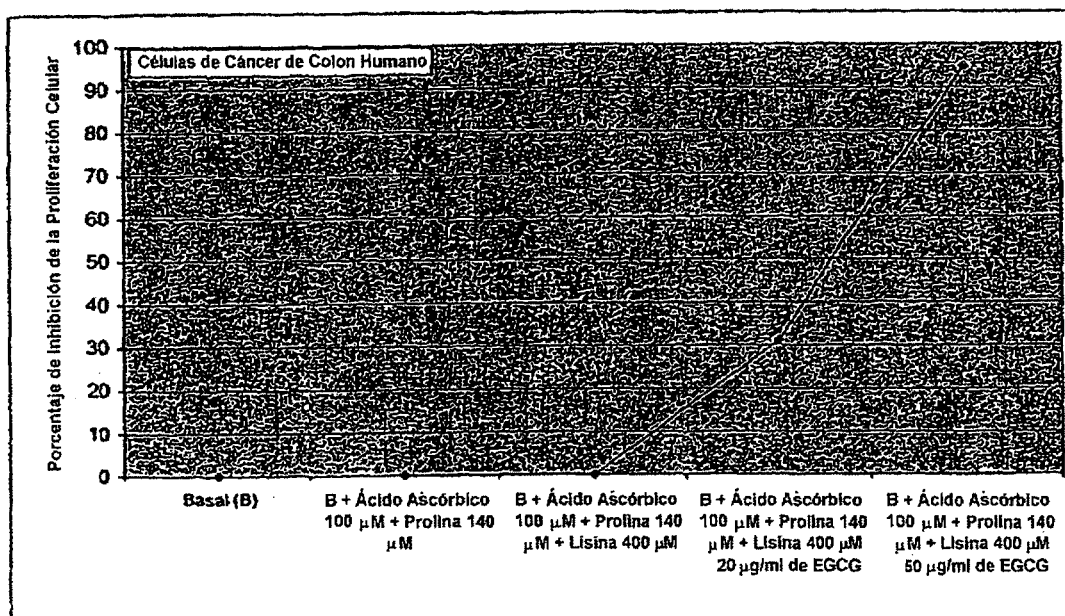


Figura 3. Efectos inhibidores de Ácido Ascórbico + Prolina; Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina; Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina + Varias Concentraciones de Galato de Epigallocatequina (EGCG) sobre la Proliferación Celular de Células de Cáncer de Mama

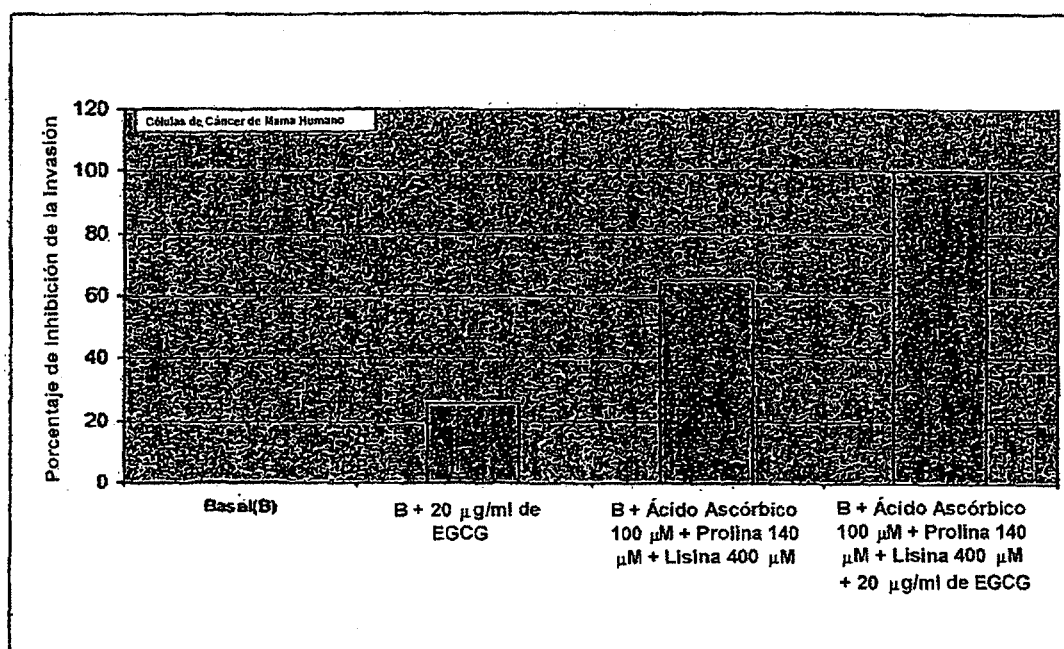


Figura 4. Efecto inhibitor sinérgico de Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina y Galato de de Epigalocatequina (EGCG) en la invasión de Matrigel por células de Cáncer de Mama Humano

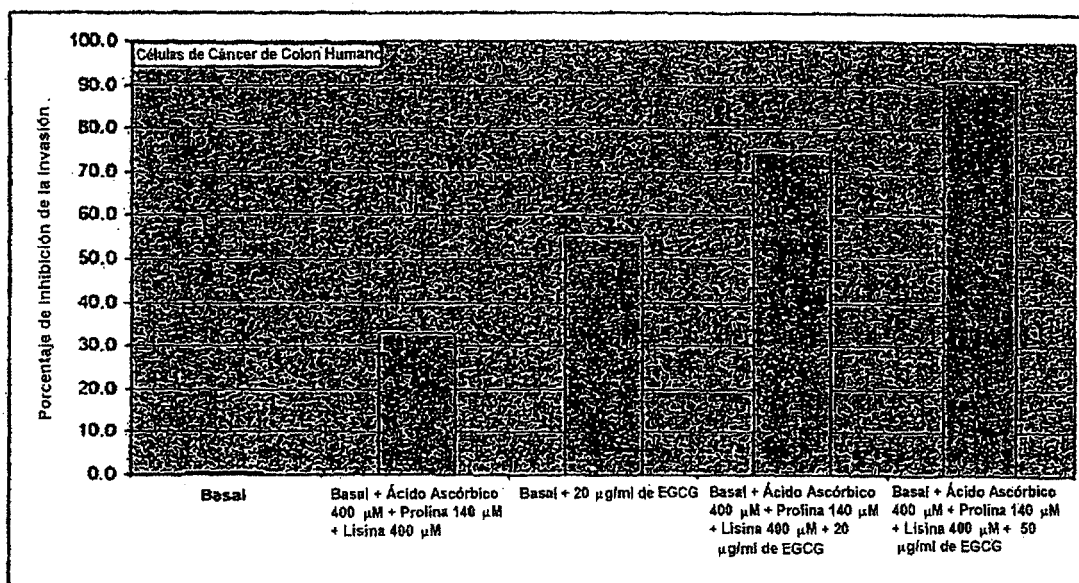


Figura 5. Efecto inhibidor sinérgico de Ácido Ascórbico + Prolina + Lisina y Galato de Epigallocatequina (EGCG) en la Invasión de Matrigel por las Células de Cáncer de Colon Humano

Calles 1 2 3 4 5 6



Figura 6: Efectos Inhibidores de Ácido Ascórbico 100 μ M + Prolina 140 μ M + Lisina 400 μ M y Varias Concentraciones de Galato de Epigalocatequina (EGCG) sobre la producción de MMP2 por Células de Cáncer de Mama Humano.

Calle 1, Basal; Calle 2, Basal + Ácido Ascórbico 100 μ M + Prolina 140 μ M + Lisina 400 μ M; Calle 3, Basal + Ácido Ascórbico 100 μ M + Prolina 140 μ M + Lisina 400 μ M + 20 μ g/ml de EGCG; Calle 4, Basal + Ácido Ascórbico 100 μ M + Prolina 140 μ M + Lisina 400 μ M + 50 μ g/ml de EGCG; Calle 5, Basal + Ácido Ascórbico 100 μ M + Prolina 140 μ M + Lisina 400 μ M + 100 μ g/ml de EGCG, Calle 6, Basal + 20 μ g/ml.

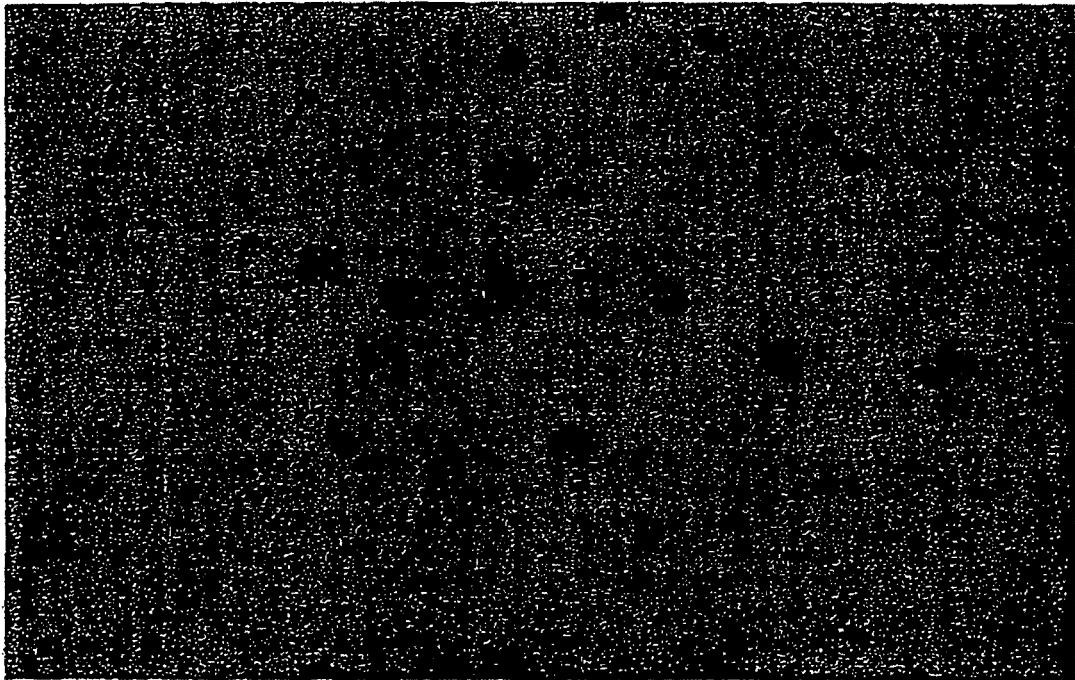


Figura 7. Células de Melanoma Normales

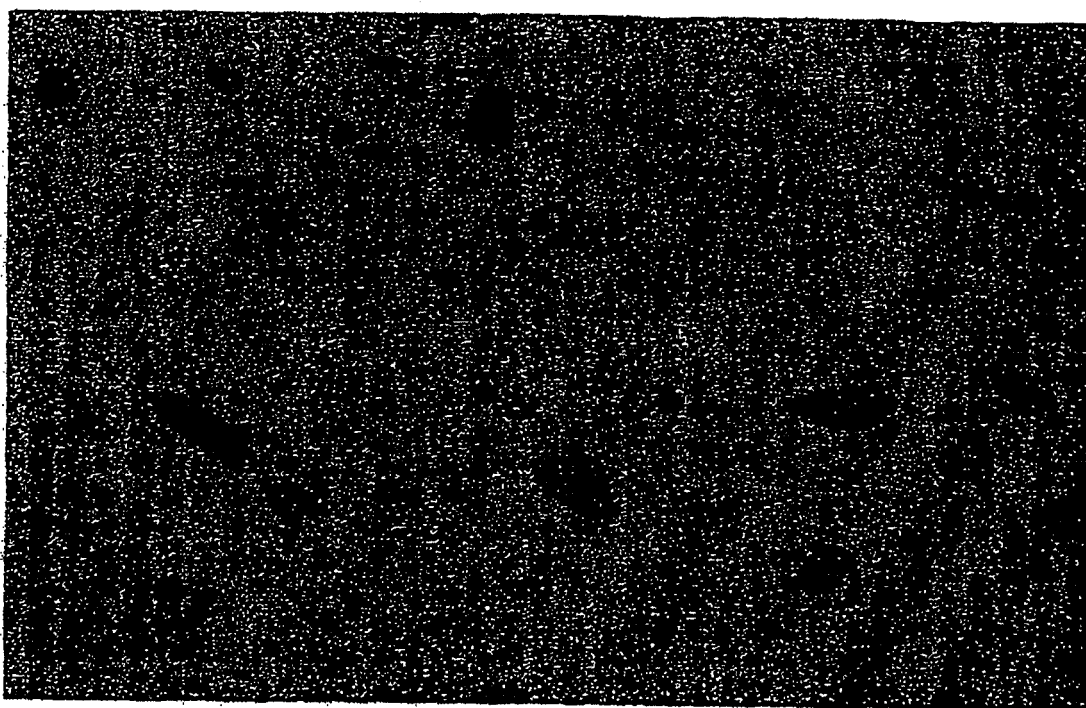


Figura 8. Efecto Apoptótico de Adición de Ácido Ascórbico 100 μ M, Prolina 140 μ M, Lisina 400 μ M y 20 μ g/ml sobre Células de Melanoma. Las células están distendidas y el núcleo se tiñe más profundamente.

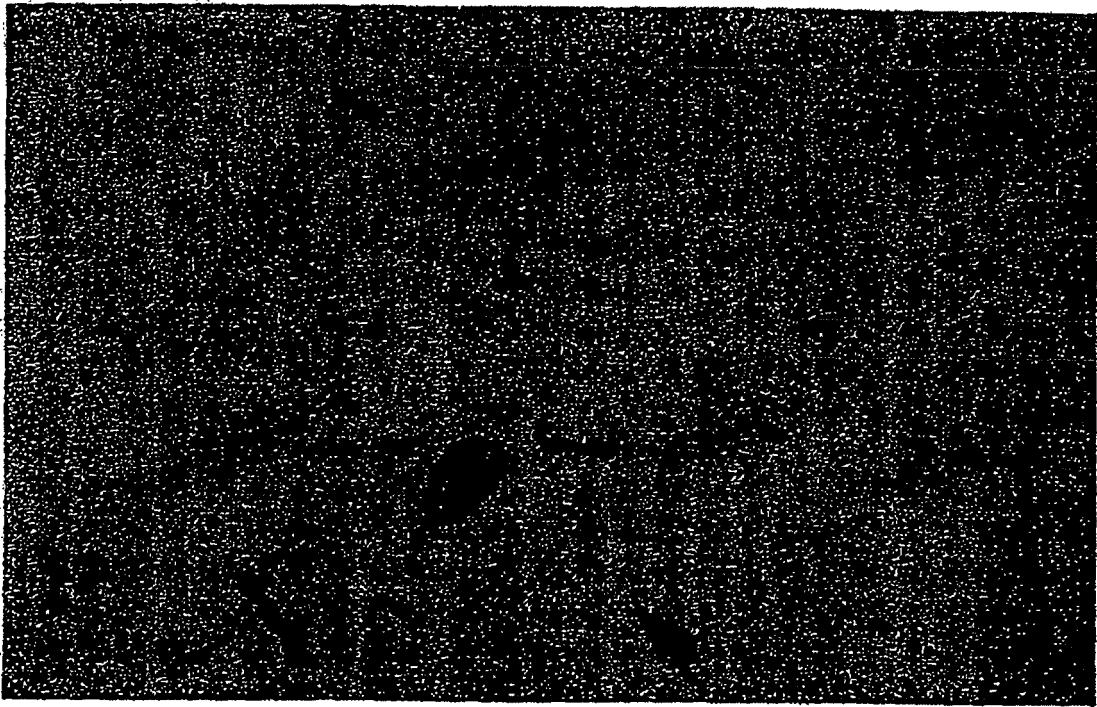


Figura 9. Efecto Apoptótico de Adición de Ácido Ascórbico 100 μ M, Prolina 140 μ M, Lisina 400 μ M y 20 μ M/ml sobre Células de Melanoma. Las células están colapsadas.