



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20040704A A2

HR P20040704A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 31/195**
A 61 K 31/375
A 61 K 35/78

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 03.08.2004.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.10.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP03/00236

Datum podnošenja međunarodne prijave 13.01.2003.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/057201

Datum međunarodne objave 17.07.2003.

(31) Broj prve prijave: 60/348,143

(32) Datum podnošenja prve prijave: 11.01.2002.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71)(72) Podnositelj prijave i izumitelj: **Matthias Rath, Twentepoort Oost 3a, 7609 RG Almelo, NL**
(72) Izumitelji: **Shrirang Netke, 3815 Susan Drive, Evergreen Ridge App. J10, San Bruno, 94066 CA, US**
Aleksandra Niedzwiecki, 1394 Heckman Way, San Jose, 95129 CA, US
(74) Punomoćnik: **Mladen VUKMIR, Zagreb, HR**

(54) Naziv izuma: **HRANJIVA FARMACEUTSKA FORMULACIJA KOJA SADRŽI POLIFENOLE I UPORABA U LIJEČENJU RAKA**

(57) Sažetak: Hranjivi sastav farmaceutске formulacije koji sadrži askorbinsku kiselinu, L-lizin, L-prolin i barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina, te se daje uporaba u liječenju raka i drugih tumora. Otkriva se sastav hranjive farmaceutске formulacije EPICAN FORTE™ i postupak njezine uporabe u prevenciji i liječenju raka.

HR P20040704A A2

OPIS IZUMA**Upućivanje na srodnu prijavu**

5 Ova prijava polaže prava na korist prema 35 U.S.C. § 119(e) U.S.C. privremenih prijava serijskog broja 60/348,143 podnesenih 11. siječnja 2002., kojih je sadržaj ovdje referencom inkorporiran u svojoj cjelokupnosti.

Područje izuma

10 Predmetni se izum odnosi na hranjivu farmaceutsku formulaciju i njenu uporabu za liječenje raka. Osobito, predmetni se izum odnosi na farmaceutske formulacije koje sadrže polifenol i imaju učinkovitu količinu polifenola za liječenje raka. Formulacija predmetnog izuma se koristi kao agens za prevenciju i liječenje raka, koji sadrži askorbinsku kiselinu, lizin, prolin i barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina.

Stanje tehnike

15 Rak je jedan od vodećih uzročnika smrti u industrijaliziranom svijetu. Ne postoji nikakvo specifično i uzročno liječenje za rak, i smrtnost od raka je među najvećim od svih bolesti. Najšire korištena liječenja, kemoterapija i radioterapija, ne razlikuju zdravo tkivo i rak i povezana su sa žestokim nuspojavama. Zbog toga postoji potreba za selektivnim liječenjem raka.

25 Jedan od ključnih mehanizama kojeg stanice raka koriste da ekspandiraju i metastaziraju u tijelu uključuje enzimatsku destrukciju okolnog vezivnog tkiva. Terapeutski pristupi za kontrolu ovog procesa putem specifičnih lijekova nisu bili uspješni i trenutno nema raspoloživih sredstava za kontrolu metastaziranja raka. Trenutni protokoli liječenja kemoterapijom i radioterapijom fokusiraju se na destrukciju stanica raka u tijelu, i oni nisu usmjereni na metastaziranje. Štoviše, ova liječenja su toksična, nespecifična i povezana sa žestokim sporednim efektima. Kemoterapija i radioterapija nose rizik razvoja novih rakova i njihovom destrukcijom vezivnog tkiva u tijelu mogu olakšati invaziju raka.

30 Da bi rasle i ekspandirale u druge dijelove tijela, stanice raka razaraju ekstracelularni matriks putem različitih metaloproteinaza matriksa (Matrix Metalloproteinases, MMPs) i plazmina, čije su aktivnosti korelirale s agresivnošću rasta tumora. Rath i Pauling (1992.) su pretpostavili da hranjive tvari kao što je neka aminokiselina, lizin i askorbinska kiselina, mogu djelovati kao prirodni inhibitori proteolize ekstracelularnog matriksa i da kao takve imaju potencijal da moduliraju rast i ekspanziju tumora. Ove hranjive tvari mogu provoditi svoj antitumorski potencijal putem nekoliko mehanizama, između njih inhibicijom MMP-a i ojačavanjem vezivnog tkiva koje okružuje stanice raka (efekt "inkapsuliranja" tumora).

35 U.S. patent br. 5,962,517 otkriva farmaceutski sastav za jednu drugu medicinsku indikaciju (liječenje akni). Otkriveni sastav sadrži komponentu za smanjivanje akni, barem jednu iz korijena čička i korijena kiselice, ili sastav na bazi katehina; i jednu komponentu za kondicioniranje kožnih stanica koja sadrži neki prelazni metal. Otkriveni sastav ne pokazuje se da ima bilo kakvu blagotvornu vrijednost u liječenju i/ili prevenciji raka.

40 PCT WO 00/76492 otkriva hranjivu formulaciju za smanjenje bolesti, koja sadrži neki katehinski spoj. Međutim, bioraspoloživost katehinskih spojeva pokazala se niskom (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)), a PCT WO 00/76492 ne uspijeva otkriti način da se poveća bioraspoloživost kolika je potrebna u liječenju i/ili prevenciji raka.

50 Demeule *et al.* otkrivaju da katehini zelenog čaja mogu imati inhibitorske efekte na metaloproteinazu matriksa. Ne postoje preporuke ili tumačenje s obzirom na to kako koristiti katehine u liječenju i/ili prevenciji raka. S obzirom na činjenicu da je bioraspoloživost polifenola kod ljudi ekstremno niska, niska tkivna koncentracija katehina uvelike smanjuje terapeutsku vrijednost polifenola uključujući epigalokatehin galat (epigallocatechin gallate, EGCG). Postoji stalna potreba da se nađe bolji farmaceutski sastav koji sadrži polifenole, a da je učinkovit u liječenju neoplastičnih bolesti i drugih bolesti uključujući upalne bolesti.

60 Postoji potreba za sigurnim i učinkovitim prirodnim pristupima koji se mogu upotrijebiti za kontrolu procesa ekspanzije raka u tijelu. Postoji također potreba za preventivnom mjerom protiv rakova ili benignih tumora da se razviju u ljudi i takva mjera bi se mogla primijeniti na pacijentima bez rizika od nuspojava povezanih s liječenjem. Hranjivi farmaceutski sastavi su postali omiljeni, kako u posljednje vrijeme raste incidencija raka. Zahtjev za takvim sastavom će se nastaviti i vjerojatno će rasti.

Izlaganje biti izuma

5 Jedan je cilj da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, koji sadrži: a) jedan askorbinski spoj; b) jedan L-lizinski spoj; c) jedan L-prolinski spoj; i d) barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina. Spojevi od a) do c) pojačavaju djelovanje polifenolnog spoja u blokiranju proliferacije i metastaziranja raka.

10 Pogodno, askorbinski se spoj odabire iz skupine koja se sastoji od askorbinske kiseline, farmaceutski prihvatljivih askorbatnih soli, askorbatnih estera i/ili njihove smjese. Pogodno, farmaceutski prihvatljiva askorbatna sol je kalcijev askorbat ili magnezijev askorbat. Pogodnije, askorbatni ester je askorbil palmitat. Pogodno, lizinski spoj se odabire iz skupine koja se sastoji od lizin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih lizinskih soli. Pogodno, prolinski spoj se odabire iz skupine koja se sastoji od prolin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih prolinskih soli.

15 Drugi je cilj, da predmetni hranjivi farmaceutski sastav nadalje sadrži neki element u tragovima odabran iz skupine koja se sastoji od selena, bakra, mangana, kalcija i magnezija.

Još je jedan cilj, da predmetni hranjivi farmaceutski sastav nadalje sadrži neku aminokiselinu. Pogodno, aminokiselina je arginin. Pogodnije, predmetni hranjivi farmaceutski sastav nadalje sadrži N-acetil cistein.

20 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, koji sadrži: a) jedan askorbinski spoj; b) jedan L-lizinski spoj; c) jedan L-prolinski spoj; d) N-acetil cistein; i c) barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina. Spojevi a) do d) pojačavaju djelovanje polifenolnog spoja u blokiranju proliferacije i metastaziranja raka.

25 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 30 mcg selena, 2 mg bakra i 1 mg mangana.

30 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 25 mg askorbinske kiseline, 25 mg kalcijevog askorbata, 25 mg magnezijevog askorbata, 25 mg askorbil palmitata, 200 mg polifenola, 10 mg N-acetil-cisteina, 50 mg lizina, 25 mg prolina, 50 mg arginina, 1 mcg selena, 20 mcg bakra i 50 mcg mangana.

35 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 5000 mg askorbinske kiseline, 5000 mg kalcijevog askorbata, 5000 mg magnezijevog askorbata, 5000 mg askorbil palmitata, 5000 mg polifenola, 1500 mg N-acetil-cisteina, 5000 mg lizina, 3000 mg prolina, 3000 mg arginina, 200 mcg selena, 9 mg bakra i 10 mg mangana.

40 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 100 mcg selena, 2 mg bakra, 1 mg mangana, 500 mg kalcija i 400 mg magnezija.

45 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 100 mcg selena, 2 mg bakra, 1 mg mangana, 500 mg kalcija, 400 mg magnezija i 200 mg citrusnih bioflavonoida.

Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, koji sadrži: L-lizin, L-prolin, L-arginin, askorbinsku kiselinu, kalcij, magnezij, polifenole, N-acetil-cistein, selen, bakar i mangan.

50 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži 1000 mg L-lizina, 750 mg L-prolina, 500 mg L-arginina, 710 mg askorbinske kiseline, 22 mg kalcija, 50 mg magnezija, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 30 mcg selena, 2 mg bakra i 1 mg mangana.

55 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje postupak za liječenje raka u nekog pojedinca, koji sadrži stupanj davanja tom pojedincu hranjivog farmaceutskog sastava kako je otkriven. Pogodno, rak se odabire iz grupe koja se sastoji od melanomskog raka, raka dojke, raka debelog crijeva, raka pluća i raka mozga.

60 Još je jedan cilj, da predmetni izum daje postupak za liječenje neke upalne bolesti u pojedinca, koji sadrži stupanj davanja tom pojedincu hranjivog farmaceutskog sastava kako je otkriven. Pogodno, upalna bolest je osteoartritis.

Kratki opis crteža

- Slika 1 prikazuje inhibitorske efekte polifenola, askorbata, prolina i lizina na migracijsko ponašanje stanica raka dojke u ljudi.
- 5 Slika 2 prikazuje inhibitorske efekte polifenola, askorbata, prolina i lizina na migracijsko ponašanje stanica raka debelog crijeva u ljudi.
- Slika 3 prikazuje inhibitorske efekte polifenola, askorbata, prolina i lizina na migracijsko ponašanje ljudskih melanomskih stanica.
- Slika 4 prikazuje inhibitorske efekte polifenola, askorbata, prolina i lizina na apoptozu ljudskih melanomskih stanica.
- 10 Slika 5 prikazuje inhibitorske efekte askorbinske kiseline, prolina, lizina i različitih količina EGCG na staničnu proliferaciju ljudskih melanomskih stanica (A 2058).
- Slika 6 prikazuje inhibitorske efekte EGCG na staničnu proliferaciju ljudskih stanica raka dojke (MDA-MB 231).
- Slika 7 prikazuje efekte suplementiranja (obogaćivanja) bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na staničnu proliferaciju ljudskih stanica raka dojke (MDA-MB 231).
- 15 Slika 8 prikazuje efekte suplementiranja bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na staničnu proliferaciju ljudskih stanica raka debelog crijeva (HCT 116).
- Slika 9 prikazuje efekte suplementiranja bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMP) u ljudskim stanicama melanoma.
- Slika 10 prikazuje efekte suplementiranja bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na Matrigel - invaziju ljudskim stanicama raka dojke (MDA-MB 231).
- 20 Slika 11 prikazuje efekte suplementiranja bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na Matrigel - invaziju ljudskim stanicama raka debelog crijeva (HTC 116).
- Slika 12 prikazuje efekte suplementiranja bazalnog medija askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i različitim količinama EGCG na smanjenje broja invazivnih stanica kod ljudskih melanomskih stanica (A 2058).

25

Detaljni opis izuma

Kako se koristi ovdje, "lizin" se koristi međusobno izmjenjivo s L-lizinom, "prolin" se koristi međusobno izmjenjivo s L-prolinom, "arginin" se koristi međusobno izmjenjivo s "L-argininom"; "vitamin C" se koristi međusobno izmjenjivo s askorbinskom kiselinom i može uključivati askorbatne soli ili askorbatne estere. "MMP-e" se odnose na metaloproteinaze matriksa; na pr. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11 i t.d. "EGCG" se odnosi na (-)-epigalokatehin-3-galat koji je glavni polifenolni sastojak prisutan u zelenom čaju. "NHDF" se odnosi na normalni ljudski kožni fibroblast (Normal Human Dermal Fibroblast), uključujući ljudske hondroците i ljudske stanice strome.

35

Predmetni izum daje hranjivi farmaceutski sastav koji sadrži askorbinsku kiselinu, lizin, prolin i barem jedan polifenolni spoj. Pogodno, askorbinski spoj se odabire iz skupine koja se sastoji od askorbinske kiseline, askorbatnih soli i askorbatnih estera. Pogodno, lizin je lizin hidroklorid ili farmaceutski prihvatljive lizinske soli. Pogodno, prolin je prolin hidroklorid ili njegove farmaceutski prihvatljive prolinske soli.

40

Polifenolni spojevi su ekstrakti zelenog čaja. Oni su također poznati kao katehini. Polifenoli su prisutni u zelenom čaju i za njih se pretpostavljalo da daju zaštitu protiv različitih oboljenja uključujući rak (Mukhtar H., Ahmed N. Am. J. Clin. Nutr. 71:1698S-1702S (2000)). Oralno davanje zelenog čaja pojačava efekte inhibiranja tumora uzrokovanog doksorubicinom u miševa. Potencijalno antikancerozno djelovanje katehina može se odnositi na njihove učinke na nekoliko faktora uključenih u proliferaciju stanica raka i njihovo metastaziranje. Za katehine je poznato da uzrokuju arest staničnog ciklusa u ljudskim karcinoma stanicama (Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Mukhtar H.J. Natl. Cancer. Inst. 89: 1881-1886 (1997)). Polifenolna frakcija iz zelenog čaja također se implicira da štiti od upale i citokina induciranih tumorima.

45

Polifenolni spojevi predstavljaju 30% suhe težine zelenog čaja. Oni uključuju flavanole, flavandiole, flavonoide i fenolne kiseline. Flavanoli su najobilniji među polifenolima u zelenom čaju i opće su poznati kao katehini. U zelenom čaju postoje četiri glavna katehina: 1) (-)-epikatehin, 2) (-)-epikatehin-3-galat, 3) (-)-epigalokatehin i 4) (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG). Među katehinima, EGCG je glavni polifenolni sastojak prisutan u zelenom čaju. EGCG je potentan antioksidativni spoj i može doprinijeti antikanceroznom djelovanju zelenog čaja. Za katehinske spojeve se izvještavalo, da provode svoje antimetastatsko djelovanje sprječavanjem procesa angiogeneze (Cao Y., Cao R. Nature 398:381 (1999)). Za EGCG je također pokazano da interferira s djelovanjem urokinaze (u-plasminogen aktivator) (Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak J.E. Nature: 387-567 (1997)), jednim od najčešće eksprimiranih enzima u ljudskih rakova. EGCG je pogodan polifenolni spoj.

55

Pogodno, polifenolni spoj se odabire iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina, katehina i drugih farmaceutski prihvatljivih polifenolnih soli i/ili njihovih smjesa.

60

Jedan od glavnih terapijskih ciljeva ove patentne prijave je prevencija digestije ekstracelularnog matriksa i njegova obnova. Askorbinska kiselina ili njena sol (t.j. askorbat) su potrebni za sintezu kolagena, elastina i drugih ključnih molekula ekstracelularnog matriksa.

- 5 Pogodno, jedna kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina se koristi da pojača antikancerozno djelovanje polifenolnih spojeva. Pogodnije, ta kombinacija pojačava polifenolne spojeve uključujući epigalokatehin galat, epikatehin galat, epigalokatehin, epikatehin i katehin na takav način, da je taj polifenolni spoj učinkovit u smanjivanju invazije stanica raka ili potpunom blokiranju invazije.
- 10 Bez ograničenja ikakvom teorijom, predmetna hranjiva farmaceutska formulacija sadrži smjesu sastojaka uključujući polifenole i za tu smjesu je pronađeno da učinkovito funkcionira u blokiranju proliferacije i procesa metastaziranja. Pronašli smo, da predmetni sastav hranjive formulacije značajno smanjuje invaziju stanica raka ili potpuno blokira metastaziranje stanica raka. Stoga, ovaj sastav učinkovito je sprječio stanice raka da se šire. Terapeutska uporaba ovog spoja za kojeg se zahtijeva zaštita, je učinkovito, selektivno i sigurno liječenje za rak dojke, debelog crijeva i drugih
- 15 organa. Pogodno, otkriveni hranjivi farmaceutski sastav može sadržavati dvije od ovih komponenata koje su kovalentno vezane.

Pogodno, učinkovitost hranjivog sastava se povećava uključivanjem spojeva poznatih da blagotvorno utječu na rast i invaziju raka i drugih tumora, uključujući L-arginin i/ili spojeve koji sadrže arginin. Pogodnije, koristi se N-acetil

20 -cistein. Još pogodnije, koriste se neka selenova sol, neka bakarna sol i neka manganova sol, koje su učinkovite da sprječice i liječe rak i druge tumore. Ovaj sastav može također uključiti jedan ili više spojeva potrebnih kao neki koenzim u Krebsovom ciklusu, respiratornom lancu, ili za druge metaboličke funkcije stanica u nekoj količini koja je učinkovita da sprječice i liječe rak i druge tumore.

25 Predmetni se hranjivi farmaceutski sastav može davati pacijentu u obliku kapsula, tableta, praškova, pilula, injekcija, infuzija, inhalacija, supozitorija ili drugih farmaceutski prihvatljivih nosilaca i/ili sredstava za predaju, za sprječavanje i liječenje raka i drugih tumora. Pogodno, hranjivi se farmaceutski sastav daje kao kapsule, tablete ili praškovi. Pogodnije, on se daje kao kapsule.

30 Predmetni se hranjivi farmaceutski sastav može koristiti u sprječavanju i liječenju raka i drugih tumora u odabranog pacijenta, gdje je tumor ili rak smješten u dojci, jajnicima, grliću maternice i drugim organima ženskog reproduktivnog sistema, plućima, jetri, koži, gastrointestinalnom sistemu, mozgu, kostima ili drugim organima tijela. Pogodno, sastav se koristi za rak pluća i rak mozga.

35 Predmetni se hranjivi farmaceutski sastav također može koristiti u sprječavanju i liječenju infektivnih bolesti, ateroskleroze, restenoze, drugih kardiovaskularnih bolesti i upalnih bolesti. Pogodno, upalna bolest je osteoartritis.

MMP-om posredovana aktivacija plazmina: Spekulira se, da se na djelovanje MMP-a može utjecati lizinom preko mehanizama posredovanih plazminom, premda drugi mehanizmi nisu isključeni. MMP-e se izlučuju kao proenzimi i njihova aktivacija je posredovana djelomično plazminom i njeno završavanje traži aktivni oblik MMP-3. Mehanizam aktivacije različitih MMP-a kojeg je potanko opisao Nagase (1997), ukazuje da MMP-3 također traži konverziju plazminogena u njegov aktivni oblik, plazmin. Aktivni centar za vezivanje plazminogena ima mjesta gdje se specifično vezuje lizin. Zbog toga lizin može interferirati s aktivacijom plazminogena u plazmin pomoću aktivatora plazminogena (Rath i Pauling, 1992), baš vezivanjem na aktivna mjesta plazminogena. Traneksamička kiselina, jedan sintetski analog

40 lizina, bila je upotrebljena da inhibira plazminom induciranu proteolizu posredstvom ovog mehanizma.

Budući da je djelovanje plazmina bitno za induciranje nekoliko tkivnih MMP-a, lizin može interferirati s konverzijom plazminogena u plazmin i time on može inhibirati aktiviranje gotovo svih MMP-a. Uz to, EGCG može vršiti inhibitorski efekt na degradaciju ekstracelularnog matriksa putem inhibicije MMP-2.

50

Invazija raka i uloga matriksa: Na invaziju stanica raka u matriks moguće je također utjecati povećavanjem stabilnosti i čvrstoće vezivnog tkiva koje okružuje stanice raka i doprinosi "inkapsulaciji" tumora. Ovo zahtijeva optimiziranje sinteze i strukture kolagenskih vlakana, za što je bitna hidroksilacija ostataka hidroksiprolina i hidroksilizina u kolagenskim vlaknima. Askorbinska kiselina može biti bitna za hidroksilaciju ovih aminokiselina. Askorbinska kiselina i L-lizin se normalno ne proizvode u ljudskom tijelu; zbog toga, suboptimalna razina ovih hranjiva moguća je u različitim patološkim fazama kao i zbog neodgovarajućih dijeta. Premda se prolin može sintetizirati iz arginina, njegova sinteza i/ili hidroksilacija može biti pogođena u patološkim uvjetima. Kao takvo, pokazano je da je sadržaj hidroksiprolina metastatskog tumorskog tkiva mnogo niži nego u ne-metastatskom tumorskom tkivu (Chubinskaia et al, 1989). Različiti lijekovi koji smanjuju metastaze također su povećali sadržaj hidroksiprolina u tim tkivima (Chubinskaia et al., 1989). Za urinarni sadržaj hidroksiprolina u pacijenata s rakom pronađeno je da je viši nego u zdravih osoba ili u pacijenata bez raka (Okazaki et al., 1992). Svi ovi nalazi sugeriraju štetne učinke stanica raka na metabolizam prolina i moguće uvjetovano pomanjkanje prolina u pacijenata s rakom.

60

Pacijenti s rakom mogu imati nedovoljne razine askorbinske kiseline. Askorbinska kiselina može biti citotoksična za maligne stanične linije i vršiti antimetastatsko djelovanje. Predmetni izum otkriva, da jedna kombinacija askorbinske kiseline, prolina, lizina i barem jednog polifenolnog spoja vrši snažan antiproliferativni i antimetastatski učinak na stanične linije raka. Pogodno, predmetna hranjiva farmaceutska formulacija je učinkovita protiv stanica melanoma, raka dojke i raka debelog crijeva. Najpogodnije, predmetna farmaceutska formulacija je učinkovita protiv stanica raka ljudskog debelog crijeva.

Polifenolni spojevi (katehini): EGCG predstavljaju jedan od katehina u ekstraktu zelenog čaja i mogu imati učinke inhibicije rasta protiv ljudskih stanica raka.

Točan temeljni mehanizam je nejasan. Predmetni izum otkriva iznenađujuću sinergiju u hranjivoj farmaceutskoj formulaciji koja sadrži askorbinsku kiselinu, prolin i lizin, te barem jedan polifenolni spoj u učinkovitom blokiranju proliferacije i metastaziranja stanica raka.

Hranjivi farmaceutski sastav po predmetnom izumu učinkovito blokira invaziju raka dojke, debelog crijeva, kože (melanoma) i drugih oblika raka. Prisutni sastojci u hranjivoj formulaciji su prirodno prisutni spojevi; i kada se koriste u zahtijevanom rasponu kako se otkriva u prijavi, pokazuje se da oni nemaju nikakve toksične nuspojave. Na taj način, ovaj se sastav može također koristiti profilaktički, t.j. za učinkovitu prevenciju raka i drugih tumora u tijelu.

Budući da virusne stanice i drugi invazivni mikroorganizmi koriste slične proteaze kao i stanice raka za širenje infekcije u tijelu, ovaj sastav za koji se traži zaštita u ovom patentu, može se koristiti za učinkovitu prevenciju i liječenje virusnih bolesti i drugih infektivnih bolesti.

Sličan mehanizam aktiviranja metaloproteinaza matriksa koje stanice raka koriste za invaziju u ekstracelularni matriks, također doprinosi destabilizaciji aterosklerotičkih plakova koji dovode do infarkta miokarda i moždanog udara. Zbog toga se ovaj sastav, za koji se traži zaštita u ovom patentu, može također koristiti za učinkovitu prevenciju i liječenje ateroskleroze, restenoze i drugih kardiovaskularnih komplikacija.

Aktiviranje metaloproteinaza matriksa, koje stanice raka koriste za invaziju u matriks, je ključna komponenta u različitim upalnim stanjima. Zbog toga se sastav za koji se traži zaštita u ovom patentu, može također koristiti za učinkovitu prevenciju i liječenje bolesti, kao što su reumatoidni artritis, emfizem, alergije, osteoartritis, te drugih stanja koji uključuju upalne aspekte.

Hranjivi farmaceutski sastav po ovom izumu može se davati pacijentu u obliku tableta, pilula, injekcija, infuzija, inhalacija, supozitorija ili drugih farmaceutski prihvatljivih nosilaca i/ili načina davanja.

PRIMJERI

Učinci askorbinske kiseline, lizina, prolina i barem jednog polifenolnog spoja proučavani su s obzirom na njihov anti-proliferativni i anti-invazivni potencijal u raznim ljudskim staničnim linijama raka. Osobito se ispitivao jedan sastojak ekstrakta zelenog čaja (t.j. epigalokatchin galat (Epigallochatchin Gallate, EGCG)).

Materijali i postupci

Stanice ljudskog raka dojke MDA-MB-231, stanice ljudskog raka debelog crijeva HCT-116, stanična linija ljudskog melanoma A2058 pribavljene su od ATCC. Normalni ljudski kožni fibroblasti pribavljeni su od GICBO. Gdje nije označeno, korišteni su mediji za kulturu stanica dobavljeni od ATCC.

U proučavanjima proliferacije stanica raka svaka je obrada ponovljena osam puta. U pokusima invazije, svaka obrada je izvedena tri ili četiri puta.

Studije proliferacije stanica

U ovim istraživanjima 5×10^4 stanica raka dojke uzgojeno je u Liebovitz-ovom mediju uz 10% fetalnog telećeg seruma (Fetal Bovine Serum, FBS) na pločama s 24 bunarića. Medij je upotrebljen kao takav (bazalni) ili s označenim suplementima (obogaćivanjem). Ploče su inkubirane u inkubatoru sa zračnom cirkulacijom (bez dodatnog CO₂) tijekom četiri dana. Stanice raka debelog crijeva HCT 116 uzgojene su u McCoy-evom 5A mediju i održavane u jednom inkubatoru s 5% CO₂ uz cirkulaciju zraka. Na kraju inkubacijskog perioda, medij je uklonjen, a stanice u bunarićima su oprane s PBS, čemu je slijedila inkubacija MTT bojom tijekom 3 sata. Svakom bunariću dodan je dimetil sulfoksid (DMSO, 1 ml). Ploče s DMSO su ostavljene da stoje pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta uz blago potresanje, a zatim se OD otopine u svakom bunariću mjerila na 550 nm. Za OD₅₅₀ DMSO otopine u bunariću smatralo se da je direktno proporcionalna s brojem stanica. OD₅₅₀ obrade koja nije sadržavala nikakav suplement (bazalni) smatrala se kao 100.

Istraživanja invazije Matrigel-a

Istraživanja su provedena koristeći Matrigel (Becton Dickinson) inserte u kompatibilne ploče s 24 bunarića. Fibroblasti su nasadeni i uzgojeni u bunarićima ploče koristeći DMEM. Kada bi fibroblasti dostigli konfluenciju, medij je bio povučen i zamijenjen sa 750 µl medija koji je određen za obradu. Stanice raka (5×10^4) suspendirane u 250 µl medija suplementiranog hranjivim tvarima, kako je specificirano u dizajnu eksperimenta nasadene su na insert u bunariću. Na taj su način i medij na insertu i u bunariću sadržavali jednake suplemente. Ploče s insertima su zatim inkubirane (u inkubatoru sa zračnom cirkulacijom za stanice MDA-MB-231, a za stanice raka debelog crijeva i stanice melanoma u inkubatoru s 5% CO₂) tijekom 18-20 sati. Nakon inkubacije, mediji iz bunarića su povučeni. Stanice na gornjoj plohi inserata su blago ostrugane pamučnom vatom na štapiću. One stanice koje su prodrle kroz Matrigel-ovu membranu i migrirale do donje površine Matrigel-a obojene su hemakolor bojom (EM Sciences) i vizualno su izbrojene pod mikroskopom. Rezultati su podvrgnuti obradi s ANOVA i svi mogući parovi testirani su za signifikantnost kod $p < 0,05$.

Mediji u različitim proučavanjima suplementirani su askorbinskom kiselinom, prolinom, lizinom i EGCG u koncentracijama kako su označene.

Želatinazna zimografija (Gelatinase Zymography)

Želatinazna zimografija je izvedena u 10% Novex prethodno pripremljenom poliakrilamidnom gelu (Invitrogen) uz prisutnost 0,1% želatine. Mediji za kulturu (20 µl) su nanoseni i SDS-PAGE je izvedena s tris-glicinskim SDS puferom. Nakon elektroforeze, gelovi su isprani s 5% Triton X-100 tijekom 30 minuta i obojeni. Proteinski standardi su istovremeno razdvojeni i određene su približne molekularne težine.

Primjer 1

Stanice raka dojke MDA-MB 231 (ATCC) nasadene su na Matrigel insert u usavršenoj Matrigel invazijskoj komori (BD). Kondicionirani mediji od normalnih ljudskih kožnih fibroblasta (Clonetics) suplementirani različitim agensima (kako je označeno na Slici 1) dodani su u bunarić. Komora je inkubirana tijekom 24 sata i stanice, koje su izvršile invaziju kroz Matrigel membranu i migrirale do donje površine membrane, su izbrojene. Ovi podaci pokazuju inhibitorski učinak epigalokatehin galata i kombinacije askorbinske kiseline, prolina i lizina na invaziju u Matrigel i migraciju stanica ljudskog raka dojke MDA-MB 231.

Primjer 2

Stanice raka ljudskog debelog crijeva HCT 116 (ATCC) nasadene su na Matrigel insert u usavršenoj Matrigel invazijskoj komori (BD). Kondicionirani mediji od normalnih ljudskih kožnih fibroblasta (Clonetics) suplementirani različitim agensima (kako je označeno na Slici 2) dodani su u bunarić. Komora je inkubirana tijekom 24 sata i stanice, koje su izvršile invaziju u Matrigel membranu i migrirale do donje površine membrane, su izbrojene. Ovi podaci pokazuju jedan inhibitorski učinak epigalokatehin galata i kombinacije askorbinske kiseline, prolina i lizina na invaziju u Matrigel i migraciju stanica ljudskog raka debelog crijeva HCT116.

Primjer 3

Stanice ljudskog melanoma A2058 (ATCC) nasadene su na Matrigel insert u usavršenoj Matrigel invazijskoj komori (BD). Kondicionirani mediji od normalnih ljudskih kožnih fibroblasta (Clonetics) suplementirani različitim agensima dodani su u bunarić. Komora je inkubirana tijekom 24 sata i stanice, koje su izvršile invaziju u Matrigel membranu i migrirale do donje površine membrane, su izbrojene. Ovi podaci pokazuju inhibitorski učinak epigalokatehin galata i kombinacije askorbinske kiseline, prolina i lizina na invaziju u Matrigel i migraciju stanica ljudskog melanoma A2058.

Primjer 4

U ovom eksperimentu stanice ljudskog melanoma A2058 (ATCC) nasadene su na Matrigel insert u usavršenoj Matrigel invazijskoj komori (BD) u prisutnosti:

A: kondicioniranih medija od normalnih ljudskih kožnih fibroblasta (Clonetics) i

B: istih medija suplementiranih različitim hranjivim tvarima kako je označeno u legendama Slike 4. Nakon 24 sata inkubacije, stanice koje su izvršile invaziju u Matrigel membranu i migrirale do donje površine membrane, ispitane su pod mikroskopom i izbrojene.

Ovi podaci pokazuju apoptotski učinak epigalokatehin galata i kombinacije askorbinske kiseline + prolina + lizina na A2058. A: Stanice ljudskog melanoma u mediju tkivne kulture. B: Stanice ljudskog melanoma u mediju tkivne kulture koji sadrži askorbinsku kiselinu (100 µM), prolin (140 µM), lizin (400 µM) i EGCG (20 µg/ml). Opaska: stanice su bile uništene.

Primjer 5Istraživanje proliferacije stanica raka5 *Stanice melanoma A2058*

Slika 5 prikazuje učinak 10, 20 i 50 µg/ml EGCG, bez i s dodavanjem lizina, prolina i askorbinske kiseline na proliferaciju stanica melanoma. Niti lizin, ni prolin, ni askorbinska kiselina, niti EGCG pri 10 i 20 µg/ml nisu imali ikakav značajan učinak na proliferaciju stanica. Međutim, EGCG pri 50 µg/ml je značajno smanjio broj stanica na 30%. Slični učinak je opažen s lizinom, prolinom i askorbinskom kiselinom.

10

Stanice raka dojke MDA-MB-231

U ovim eksperimentima, bazalni medij suplementiran je s 0, 10, 20, 50, 100 ili 200 µg/ml EGCG (Slika 6). Rezultati pokazuju, da je suplementiranje bazalnog medija s 50, 100 i 200 µg/ml EGCG značajno smanjilo broj stanica do $66,1 \pm 5,3\%$; $33,6 \pm 2 \%$ i $29,6 \pm 0,8\%$ u usporebi s odnosnim nesuplementiranim kontrolama. Koncentracije EGCG u staničnom mediju do 20 µg/ml nisu imale ikakav značajan inhibitori učinak na proliferaciju stanica.

15

Istraživali smo također učinke askorbinske kiseline, lizina, prolina i različitih koncentracija EGCG na proliferaciju stanica raka. Slika 7 pokazuje beznačajno smanjeni broj stanica do $86,1 + 1,93\%$ s askorbinskom kiselinom, lizinom i prolinom. Daljnje dodavanje od 20, 50 i 100 µg EGCG ovoj kombinaciji značajno je smanjilo broj stanica na $74 \pm 5,8\%$; $64,8 \pm 1,6\%$ i $22 \pm 5\%$ u usporedbi s odnosnom kontrolnom skupinom.

20

Stanice raka debelog crijeva HCT 116

Dok inhibitori učinak askorbinske kiseline, prolina i lizina na proliferaciju stanica raka debelog crijeva nije bio naglašen, kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina s 20 µg/ml EGCG je značajno snizila broj stanica do $69 \pm 0,5\%$ (Slika 8). Viša koncentracija EGCG u ovoj kombinaciji (50 µg/ml) drastično je smanjila broj stanica na $4,6 \pm 0,3\%$.

25

Antiproliferativno djelovanje hranjivih kombinacija korištenih u ovim istraživanjima variralo je s tipom stanica raka. U stanicama raka dojke, kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina s EGCG imala je veće antiproliferativne efekte od onih kada su te hranjive tvari korištene pojedinačno. U stanicama melanoma i raka debelog crijeva izloženim kombinaciji askorbinske kiseline, prolina i lizina nije bilo utjecaja na njihovu proliferaciju. Međutim, kombiniranjem ovih hranjivih tvari s 20 µg/ml EGCG rezultiralo je značajnim smanjenjem broja stanica raka debelog crijeva, ali ne i stanica melanoma. Čini se, da su stanice raka debelog crijeva osjetljivije od stanica raka dojke i stanica melanoma, na najmanju kombinaciju askorbinske kiseline, prolina, lizina i EGCG. Proliferacija stanica raka debelog crijeva je gotovo potpuno reducirana (4,6%) kada se askorbinsku kiselinu, prolin i lizin davalo s 50 µg/ml EGCG.

30

35

Primjer 6Želatinazna zimografska ispitivanja

Učinak EGCG na stanice melanoma s bazalnim medijem i suplementiranjem askorbinske kiseline, prolina i lizina na ekspresiju MMP-a prikazan je na Slici 9 pomoću želatinazne zimografije. Stanice melanoma pokazale su dvije pruge koje odgovaraju MMP-2 i MMP-9. Kombinacija askorbinske kiseline, lizina i prolina nema nikakvog efekta na ekspresiju MMP-pruga u usporedbi s bazalnim medijem. Međutim, EGCG inhibira ekspresiju i MMP-2 i MMP-9 na način koji je zavisen o dozi. Intenzitet pruga u bazalnim uvjetima i u kombinaciji askorbinske kiseline, lizina i prolina bio je isti.

45

Primjer 7Istraživanja invazije ekstracelularnog matriksa i migracije

Ispitivali su se inhibitori efekti kombinacije askorbinske kiseline, prolina i lizina korištene odvojeno, kao i zajedno s različitim koncentracijama EGCG. Istraživali su se efekti ovih kombinacija na ekstracelularni matriks koristeći prethodno formirane Matrigel matrice, koje se rutinski koriste da se odredi visina invazivnog potencijala različitih staničnih linija raka.

50

55

Stanice raka dojke MDA-MB-231

Slika 10 prikazuje rezultate invazije u Matrigel stanica raka dojke inkubiranih u prisutnosti askorbinske kiseline, prolina i lizina. Invazija stanica raka inkubiranih u kombinaciji askorbinske kiseline, prolina i lizina smanjena je do $48,1 \pm 22,1\%$ u usporedbi sa stanicama inkubiranim u mediju bez suplemenata. U mediju suplementiranom sa samo 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG, broj invazivnih stanica smanjio se do $69,5 \pm 27,4\%$. Potpuna inhibicija invazije matriksa stanicama raka dojke postigla se u prisutnosti viših koncentracija EGCG (50 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$).

U drugom nizu istraživanja, suplementiranje medija sa 100 μM askorbinske kiseline smanjilo je invaziju za 36%. Suplementiranje askorbinskom kiselinom i 140 μM prolina dalje je smanjilo invaziju za 47%. Koristeći 400 μM lizina uz askorbinsku kiselinu i prolin u suplementu dalje je smanjilo invaziju za 67%; lizin pokazuje linearni odgovor u pojačavanju efekata askorbinske kiseline i prolina do razine od 800 μM .

Slika 10 također pokazuje da je kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina kao i 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG bila učinkovita u potpunom zaustavljanju invazije stanica raka kroz ekstracelularni matriks. Ova je kombinacija omogućila da se dostigne maksimalni inhibitorski efekt na invaziju stanica raka bez nužde da se koriste visoke koncentracije pojedinih hranjivih tvari. Kao takvi, askorbinska kiselina, prolin i lizin zajedno s EGCG omogućili su da se potpuno zaustavi invazija u matriks od strane stanica raka dojke pri nižoj razini EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$).

Stanice raka debelog crijeva HCT116

Slika 11 prikazuje da je kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina značajno smanjila invaziju stanica raka debelog crijeva do $67,2 \pm 3,7\%$. EGCG korišten samostalno pri 20 $\mu\text{g/ml}$ smanjio je invaziju do $44,9 \pm 3,3\%$, dok je kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina, te 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG imala sinergistički efekt smanjujući invaziju stanica raka debelog crijeva do $24,9 \pm 4,6\%$.

Stanice melanoma A2058

Slika 12 prikazuje da je kombinacija askorbinske kiseline, prolina i lizina bila učinkovita u smanjivanju broja invazivnih stanica do $88,2 \pm 4\%$, međutim ovo opadanje nije bilo statistički značajno. Kombiniranjem ovih hranjivih tvari s tako malo, kao što je 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG, bilo je učinkovito u smanjivanju broja invazivnih stanica do nule.

Ovi rezultati pokazuju da nam je uporaba askorbinske kiseline, prolina i lizina s EGCG omogućila da dobijemo drastično smanjenje broja stanica koje su izvršile invaziju i migrirale kroz Matrigel membranu pri nižim razinama EGCG. Invazija je smanjena do nule koristeći tako nisku razinu kao 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG s askorbinskom kiselinom, prolinom i lizinom kod stanica raka dojke i stanica melanoma. Blagodati rezultata ove kombinacije nisu bile tako spektakularne sa stanicama raka debelog crijeva, kako je dobiveno sa stanicama raka dojke. Razina EGCG morala je biti na 50 $\mu\text{g/ml}$ da se dobije 90% smanjenje invazije ovim stanicama. U ovom istraživanju, nisu opažene nikakve promjene u ekspresiji MMP u stanicama melanoma, premda EGCG ima inhibitorski učinak na njihovu ekspresiju na način koji je zavisian o dozi.

Ovi nizovi istraživanja uvjerljivo demonstriraju da predmetna hranjiva farmaceutska formulacija koja sadrži askorbinsku kiselinu, prolin, lizin i barem jedan polifenolni spoj vrši učinkovite anti-proliferativne i anti-invazivne učinke na stanice raka.

Primjer 8

Slijedeće hranjive farmaceutske formulacije (Tablice 1-5) i EPICAN FORTE™ (Tablica 6) ilustrirane su za njihovo pripravljanje. Za ove formulacije, koje sadrže askorbinsku kiselinu, prolin, lizin i barem jedan polifenolni spoj, pronađeno je da su učinkovite u blokiranju invazije stanica raka i metastaza stanica raka.

Tablica 1 Formulacija 1

Biokemijske supstance	Količina	%
Askorbinska kiselina	250 mg	5,6
Kalcijev askorbat	250 mg	5,6
Magnezijev askorbat	250 mg	5,6
Askorbil palmitat	250 mg	5,6
Polifenoli	1000 mg	22,5
N-acetil-cistein	200 mg	4,5
Lizin	1000 mg	22,5
Prolin	750 mg	16,8
Arginin	500 mg	11,2
Selen	30 mcg	<0,01
Bakar	2 mg	0,04

Mangan 1 mg 0,02
 mg = miligrami
 mcg = mikrogrami
 "%" se odnosi na tež.% pojedinog sastojka u ukupnoj težini formulacije

5 **Tablica 2 Formulacija 2**

Biokemijske supstance	Količina	%
Askorbinska kiselina	25 mg	5,7
Kalcijev askorbat	25 mg	5,7
Magnezijev askorbat	25 mg	5,7
Askorbil palmitat	25 mg	5,7
Polifenoli - 50%	200 mg	46,0
N-acetil-cistein	10 mg	2,3
Lizin	50 mg	11,5
Prolin	25 mg	5,7
Arginin	50 mg	11,5
Selen	1 mcg	<0,001
Bakar	20 mcg	<0,001
Mangan	50 mcg	<0,001

mg = miligrami
 mcg = mikrogrami
 "%" se odnosi na tež.% pojedinog sastojka u ukupnoj težini formulacije

10 **Tablica 3 Formulacija 3**

Biokemijske supstance	Količina	%
Askorbinska kiselina	5000 mg	13,3
Kalcijev askorbat	5000 mg	13,3
Magnezijev askorbat	5000 mg	13,3
Askorbil palmitat	5000 mg	13,3
Polifenoli - 100%	5000 mg	13,3
N-acetil-cistein	1500 mg	4,0
Lizin	5000 mg	13,3
Prolin	3000 mg	8,0
Arginin	3000 mg	8,0
Selen	200 mcg	<0,001
Bakar	9 mg	0,02
Mangan	10 mg	0,002

mg = miligrami
 mcg = mikrogrami
 "%" se odnosi na tež.% pojedinog sastojka u ukupnoj težini formulacije

15 **Tablica 4 Formulacija 4**

Biokemijske supstance	Količina	%
Askorbinska kiselina	250 mg	4,7
Kalcijev askorbat	250 mg	4,7
Magnezijev askorbat	250 mg	4,7
Askorbil palmitat	250 mg	4,7
Polifenoli - 98%	1000 mg	18,7
N-acetil-cistein	200 mg	3,7
Lizin	1000 mg	18,7
Prolin	750 mg	14,0
Arginin	500 mg	9,3
Selen	100 mcg	<0,002
Bakar	2 mg	0,04
Mangan	1 mg	0,02
Kalcij	500 mg	9,3
Magnezij	400 mg	7,5

mg = miligrami
 mcg = mikrogrami
 "%" se odnosi na tež.% pojedinog sastojka u ukupnoj težini formulacije

Tablica 5 Formulacija 5**Biokemijske supstance**

	Količina	%
Askorbinska kiselina	250 mg	4,5
Kalcijev askorbat	250 mg	4,5
Magnezijev askorbat	250 mg	4,5
Askorbil palmitat	250 mg	4,5
Polifenoli - 98%	1000 mg	18
N-acetil-cistein	200 mg	3,6
Lizin	1000 mg	18
Prolin	750 mg	13,5
Arginin	500 mg	9
Selen	100 mcg	<0,002
Bakar	2 mg	<0,04
Mangan	1 mg	<0,02
Kalcij	500 mg	9
Magnezij	400 mg	7,2
Citrusni bioflavonoidi	200 mg	3,6

mg = miligrami

mcg= mikrogrami

"% " se odnosi na tež.% pojedinog sastojka u ukupnoj težini formulacije

5

Tablica 6 Formulacija za EPICAN FORTE™

Veličina doziranja: 6 kapsula (Predložena uporaba: po dvije kapsule tri puta dnevno, pogodno uz obroke)

6 kapsula sadrži	Količina doziranja	% dnevne vrijednosti
L-lizin	1000 mg	
L-prolin	750 mg	
L-arginin	500 mg	
Vitamin C (kao askorbinska kiselina, kalcijev askorbat, magnezijev askorbat i askorbatni palmitat)	782 mg	1180%
Kalcij (iz kalcijevog askorbata)	22 mg	2%
Magnezij (iz magnezijevog askorbata)	50 mg	12%
Ekstrakt standardnog zelenog čaja (list) (80% polifenola - 800 mg) dekofeiniran	1.000 mg	
N-acetil-cistein	200 mg	
Selen (iz L-selenometionina)	30 mg	43%
Bakar (iz bakarnog glicinata)	2 mg	100%
Mangan (iz manganovog citrata)	1 mg	50%

mg = miligrami

mcg= mikrogrami

10

EPICAN FORTE™ je ime trgovačke marke iz U.S. prijave u postupku

Drugi sastojci: Vegetarian kapsule (hidroksipropil metilceluloza), silicijev dioksid, celuloza i magnezijev stearat.

Primjer 915 **Efekti EPICAN FORTE™ na stanice ljudskog raka**

Istraživani su efekti EPICAN FORTE™ na stanice ljudskog raka. Ispitani su metastatski parametri kao što je ekspresija metaloproteinaza matriksa (MMP) pomoću želatinazne zimografije, invazijski potencijal kroz Matrigel i proliferacija/rast pomoću MTT analiza. Protokoli za ove analize detaljno su opisani kao gore. Korišteno je nekoliko ljudskih staničnih linija raka: raka kože - stanice melanoma 2058, raka jetre - stanice HepG2, fibrosarkoma - stanice HT 1080, raka debelog crijeva - HCT 116, raka dojke - ER+/-MCF-7 i raka dojke ER-/- MDA-MB-231.

20

Slijedeće tablice (Tablice 7 i 8) sumiraju rezultate:

25

Efekti EPICAN FORTE™ na proliferaciju/rast ljudskih staničnih linija raka:

Tablica 7 Doze tretiranja s EPICAN FORTE™ µg/ml : Postotak od kontrole

Stanice raka	0	10	50	100	500	1000
Melanom	100%	98	-	105	-	50
Hep G2	100%	92	-	138	-	85
HT-1080	100%	100	-	97	80	63
Debelo crijevo (HCT 116)	100%	119	125	141	120	106
MCF-7	100%	93	88	92	97	77
MDA-MB-231	100%	103	-	82	-	25

5 Efekti EPICAN FORTE™ na invaziju u Matrigel i migraciju ljudskih stanica raka:

Tablica 8 Doze tretiranja s EPICAN FORTE™ µg/ml: Postotak inhibicije

Stanica raka	0	10	50	100	500	1000
Melanom	0%	80	98	100	-	-
Hep G2	0%	15	25	50	95	100
HT-1080	0%	90	-	50	70	100
Debelo crijevo (HCT 116)	0%	20	50	80	100	-
MDA-MB-231	0%	50	-	98	-	-
MCF-7	Nije invazivna					

Efekti EPICAN FORTE™ na ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMP) po ljudskim staničnim linijama raka:

10

Stanice melanoma: Stanice melanoma su pokazivale dvije pruge u želatinaznoj zimografiji koje odgovaraju MMP-2 i MMP-9. EPICAN FORTE™ inhibirao je ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na način zavisian o dozi. Ekspresija MMP-2 i MMP-9 je bila značajno inhibirana s koncentracijom od 100 µg/ml od EPICAN FORTE™ i zapravo se nije mogla detektirati kod koncentracije od 1000 µg/ml.

15

Stanice HepG2: Kao i stanica melanoma, HepG2 je također eksprimirala dvije pruge koje odgovaraju MMP-2 i MMP-9. EPICAN FORTE™ inhibirao je ekspresiju MMP-2 i MMP-9 pri koncentracijama od 500 i 1000 µg/ml.

20

Fibrosarkom HT-1080: Stanice HT-1080 su pokazivale dvije pruge za MMP-2 i MMP-9. EPICAN FORTE™ je također inhibirao ekspresiju obje pruge na način zavisian o dozi. Vrlo blijede pruge videne su pri koncentracijama od 500 i 1000 µg/ml.

25

Rak debelog crijeva HCT 116: Stanice raka debelog crijeva pokazale su samo jednu prugu u zimografiji koja odgovara MMP-2, a koja je potpuno nestala pri koncentraciji od 100 µg/ml.

MCF-7 i MDA-MB-231: Ove stanične linije raka nisu pokazivale nikakve MMP pruge pod našom eksperimentalnom koncentracijom, a koje su bile slične drugim staničnim linijama raka.

30

Invazija MDA-MB-231 kroz Matrigel bila je inhibirana za 50%, 60% i 95% pri odgovarajućim 10, 50, i 100 µg/ml koncentracijama EPICAN FORTE™. EPICAN FORTE™ nije bio toksičan za MDA-MB-231 pri 10 µg/ml, a pokazao je blagu toksičnost pri 100 µg/ml. Međutim, on je pokazao značajnu toksičnost pri 1000 µg/ml. Niti MMP-2 niti MMP-9 nisu eksprimirani prema zimografiji. Nasuprot tome, EPICAN FORTE™ nije bio toksičan prema MCF-7, čak pri 500 µg/ml, a pokazivao je blagu toksičnost pri 1000 µg/ml. MCF-7 nisu bile invazivne i nisu eksprimirale aktivnost MMP.

35

EPICAN FORTE™ inhibira ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na način zavisian o dozi. Ekspresija MMP-2 i MMP-9 značajno je inhibirana pri koncentraciji od 100 µg/ml EPICAN FORTE™, a zapravo se nije mogla detektirati pri koncentraciji od 10 µg/ml. EPICAN FORTE™ korišten pri koncentracijama 10 i 100 µg/ml nije značajno utjecao na staničnu vitalnost, a pri 100 µg/ml on je pokazao citotoksičnost u rasponu od 10-40 postotaka, zavisno o tipu stanica. Invazija stanica melanoma, stanica MDA-MB-231 i ko-kultura stanica melanoma s NHDF kroz Matrigel se značajno smanjila na način zavisian o dozi. Invazija stanica HT-1080 kroz Matrigel se inhibirala za 10%, 50%, 70% i 100% pri odgovarajućim 10, 100, 200, 1000 µg/ml. Zanimljivo, EPICAN FORTE™ nije bio toksičan za stanice HT-1080 pri 100 µg/ml. Ovi rezultati demonstriraju, da je EPICAN FORTE™ vrlo učinkovit za nekoliko staničnih linija raka i također u ko-kulturi. Ova opažanja otkrivaju da EPICAN FORTE™ može dati jednu prirodnu terapijsku osnovu koja ga čini vrijednim i obećavajućim kandidatom za liječenje raka kod ljudi.

45

Primjer 10Efekti EPICAN FORTE™ na normalne ljudske stanične linije

Istraživani su efekti EPICAN FORTE™ na normalne ljudske stanice. Korišteni su parametri slični onima za stanične linije raka; naime zimografija za ekspresiju MMP, invazija kroz Matrigel i proliferacija/rast s MTT pokusima. Korišteno je nekoliko normalnih ljudskih kožnih fibroblasta (Normal Human Dermal Fibroblast, NHDF), uključujući: ljudske hondroците i ljudske stanice strome.

Slijedeće tablice (Tablice 9, 10 i 11) sumiraju efekte EPICAN FORTE™ na proliferaciju/rast, metastatsku invaziju i produkciju MMP u normalnim ljudskim stanicama:

Tablica 9 Efekti EPICAN FORTE™ na proliferaciju/rast normalnih ljudskih stanica. Doze tretiranja s EPICAN FORTE™ (µg/ml): Postotak od kontrole

Normalne stanice	0	10	50	100	500	1000
NHDF	100%	118	-	135	-	90
Hondroците	100%	113	-	148	76	82
Stanice strome	100%	100	116	115	98	64

Tablica 9 Efekti EPICAN FORTE™ na invaziju normalnih ljudskih stanica u Matrigel. Doze tretiranja s EPICAN FORTE™ (µg/ml): Postotak inhibicije

Normalne stanice	0	10	50	100	200	1000
NHDF	0%	67%	89%	100%	-	-
Hondroците	0%	45%	85%	95%	100%	-
Stanice strome	0%	0%	-	95%	100%	-

Efekti EPICAN FORTE™ na ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMP) u normalnim ljudskim stanicama sumirani su kako slijedi:

NHDF: NHDF je ekspimirao samo jednu prugu u zimografiji koja odgovara MMP-2, koja zapravo nestaje pri koncentraciji od 1000 µg/ml EPICAN FORTE™.

Hondroците: Hondroците su također pokazale samo jednu prugu koja odgovara MMP-2. EPICAN FORTE™ inhibirao je ekspresiju MMP-2 na način zavisen o dozi. Ekspresija MMP-2 bila je značajno inhibirana pri koncentraciji od 100 µg/ml EPICAN FORTE™ i potpuno je nestala pri koncentraciji od 200 µg/ml EPICAN FORTE™.

Stanice strome: Stanice strome su također pokazivale samo jednu prugu koja odgovara MMP-2. EPICAN FORTE™ inhibirao je ekspresiju MMP-2 na način zavisen o dozi. Vrlo blijeda pruga videna je pri koncentracijama od 50 i 100 µg/ml, koja nije detektirana pri koncentracijama od 200 i 500 µg/ml.

Sumarno, rezultati su ukazali da EPICAN FORTE™ inhibira ekspresiju MMP-2 na način zavisen o dozi. Ekspresija MMP-2 bila je značajno inhibirana pri koncentraciji od 100 µg/ml EPICAN FORTE™ i zapravo nije detektirana pri koncentraciji od 200 µg/ml. Uz to, pronađeno je također, da je invazija hondroците kroz Matrigel inhibirana za 50%, 85% i 95% pri 10 µg/ml, 100 µg/ml i 200 µg/ml. Pri 500 µg/ml invazija je potpuno smanjena na 0%.

EPICAN FORTE™ nije bio toksičan za hondroците, čak pri koncentraciji od 200 µg/ml. U stvari, EPICAN FORTE™ je izvršio učinak proliferacije stanica, 70% porasta u proliferaciji stanica s 200 µg/ml, 70% više od kontrole. Blagi toksični efekt zapažen je samo pri 500 µg/ml. Ovi rezultati demonstriraju, da je EPICAN FORTE™ učinkovit u inhibiranju ekspresije MMP-2 i da EPICAN FORTE™ predstavlja jednu novu anti-upalnu hranjivu formulaciju kao prirodni pristup za inhibiranje produkcije MMP i degradacije ekstracelularnog matriksa u osteoartritisu i drugim srodnim bolestima uključujući ekscesivnu degradaciju hrskavice.

Premda su *in vivo* pokusne linije EPICAN FORTE™ upravo započele s istraživanjima, izvješteno je već o dva slučaja koji dokazuju vrijednost EPICAN FORTE™ kao medikamenta za liječenje raka.

Jedna ženska pacijentica s dijagnosticiranim tumorom mozga liječena je kemoterapijom i radioterapijom bez uspjeha i krajem travnja 2002. od nje se odustalo. Slučajno su tu pacijenticu započeli liječiti s Epican-Forte u preporučenim dozama. Krajem kolovoza 2002. MRTS je pokazao da je tumor nestao.

Jednom muškom pacijentu starom 64 godine, koji je imao jako povišenu razinu tumorskog markera PSA u svibnju 2002. (59,9 µg/l), dijagnosticirano je da ima metastaze karcinoma prostate duž limfnih sudova na aorti. On je započeo liječenjem s Epican-Forte u preporučenim dozama. Tri mjeseca kasnije razina PSA pala je na 0,9 µg/l. Kontrola CT-om krajem listopada 2002. pokazala je da prethodno vidljive limfatičke metastaze više nisu očite, a njegova prostata bila je normalne veličine.

Opisan je određen broj izvedbi ovog izuma. Bez obzira na to, treba podrazumijevati, da se mogu napraviti različite modifikacije bez odstupanja od duha i opsega ovog izuma.

PATENTNI ZAHTJEVI

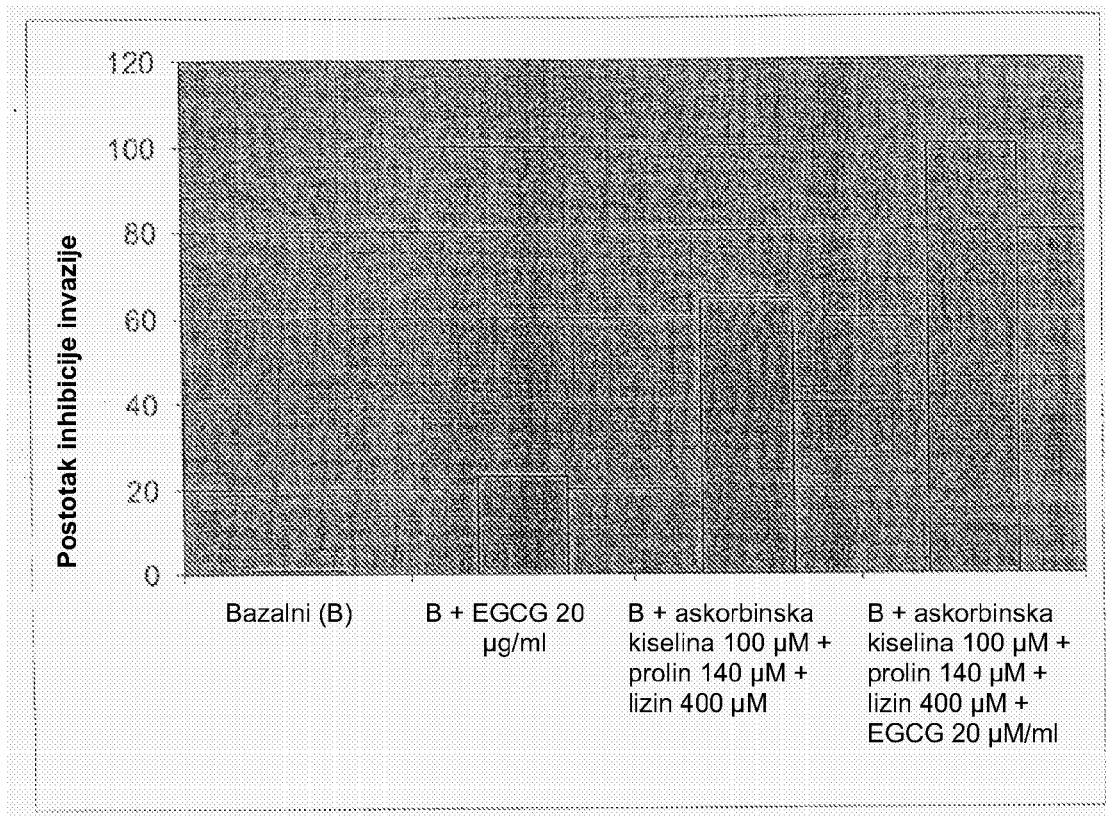
1. Hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, **naznačen time**, da sadrži:
 - a) jedan askorbinski spoj;
 - b) jedan L-lizinski spoj;
 - c) jedan L-prolinski spoj; i
 - d) barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina, u čemu spojevi a) do c) pojačavaju aktivnost polifenolnog spoja u blokiranju proliferacije raka i metastaze.
2. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da se askorbinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od askorbinske kiseline, farmaceutski prihvatljivih askorbatnih soli, askorbatnih estera i/ili njihovih smjesa.
3. Hranjivi sastav prema patentnom zahtjevu 2, **naznačen time**, da farmaceutski prihvatljiva askorbatna sol jest kalcijev askorbat ili magnezijev askorbat.
4. Hranjivi sastav prema patentnom zahtjevu 2, **naznačen time**, da askorbatni ester jest askorbil palmitat.
5. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da se lizinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od lizin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih lizinskih soli.
6. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da se prolinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od prolin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih prolinskih soli.
7. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da nadalje sadrži neki element u tragovima, odabran iz skupine koja se sastoji od selena, bakra, mangana, kalcija i magnezija.
8. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da nadalje sadrži jednu aminokiselinu.
9. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 8, **naznačen time**, da aminokiselina jest arginin.
10. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 1, **naznačen time**, da nadalje sadrži N-acetil cistein.
11. Hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, **naznačen time**, da sadrži:
 - a) jedan askorbinski spoj;
 - b) jedan L-lizinski spoj;
 - c) jedan L-prolinski spoj;
 - d) N-acetil cistein; i
 - e) barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina, u čemu spojevi a) do d) pojačavaju aktivnost polifenolnog spoja u blokiranju proliferacije raka i metastaze.
12. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time**, da se askorbinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od askorbinske kiseline, farmaceutski prihvatljivih askorbatnih soli, askorbatnih estera i/ili njihovih smjesa.
13. Hranjivi sastav prema patentnom zahtjevu 12, **naznačen time**, da farmaceutski prihvatljiva askorbatna sol jest kalcijev askorbat ili magnezijev askorbat.
14. Hranjivi sastav prema patentnom zahtjevu 12, **naznačen time**, da askorbatni ester jest askorbil palmitat.
15. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time**, da se lizinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od lizin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih lizinskih soli.
16. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time**, da se prolinski spoj odabire iz skupine koja se sastoji od prolin hidroklorida i farmaceutski prihvatljivih prolinskih soli.
17. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time**, da sastav nadalje sadrži jedan element u tragovima, odabran iz skupine koja se sastoji od selena, bakra, mangana, kalcija i magnezija.
18. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 11, **naznačen time**, da nadalje sadrži jednu aminokiselinu.
19. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 18, **naznačen time**, da aminokiselina jest arginin.
20. Hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, **naznačen time**, da sadrži: askorbinsku kiselinu, kalcijev askorbat, magnezijev askorbat, askorbil palmitat, polifenole, N-acetil cistein, lizin, prolin, arginin, selen, bakar i mangan.
21. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 20, **naznačen time**, da sastav sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg

- polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 30 mcg selen, 2 mg bakra i 1 mg mangana.
22. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 20, **naznačen time**, da sastav sadrži 25 mg askorbinske kiseline, 25 mg kalcijevog askorbata, 25 mg magnezijevog askorbata, 25 mg askorbil palmitata, 200 mg polifenola, 10 mg N-acetil-cisteina, 50 mg lizina, 25 mg prolina, 50 mg arginina, 1 mcg selen, 20 mcg bakra i 50 mcg mangana.
23. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 20, **naznačen time**, da sastav sadrži 5000 mg askorbinske kiseline, 5000 mg kalcijevog askorbata, 5000 mg magnezijevog askorbata, 5000 mg askorbil palmitata, 5000 mg polifenola, 1500 mg N-acetil-cisteina, 5000 mg lizina, 3000 mg prolina, 3000 mg arginina, 200 mcg selen, 9 mg bakra i 10 mg mangana.
24. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 20, **naznačen time**, da sastav sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 100 mcg selen, 2 mg bakra, 1 mg mangana, 500 mg kalcija i 400 mg magnezija.
25. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 20, **naznačen time**, da sastav sadrži 250 mg askorbinske kiseline, 250 mg kalcijevog askorbata, 250 mg magnezijevog askorbata, 250 mg askorbil palmitata, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 1000 mg lizina, 750 mg prolina, 500 mg arginina, 100 mcg selen, 2 mg bakra, 1 mg mangana, 500 mg kalcija, 400 mg magnezija i 200 mg citrusnih bioflavonoida.
26. Hranjivi farmaceutski sastav koristan u liječenju raka, **naznačen time**, da sadrži: L-lizin, L-prolin, L-arginin, askorbinsku kiselinu, kalcij, magnezij, polifenole, N-acetil-cistein, selen, bakar i mangan.
27. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 26, **naznačen time**, da sastav sadrži 1000 mg L-lizina, 750 mg L-prolina, 500 mg L-arginina, 710 mg askorbinske kiseline, 22 mg kalcija, 50 mg magnezija, 1000 mg polifenola, 200 mg N-acetil-cisteina, 30 mcg selen, 2 mg bakra i 1 mg mangana.
28. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 27, **naznačen time**, da se askorbinska kiselina odabire iz skupine koja se sastoji od askorbinske kiseline, kalcijevog askorbata, magnezijevog askorbata i askorbil palmitata.
29. Hranjivi farmaceutski sastav prema patentnom zahtjevu 27, **naznačen time**, da je polifenol odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina, katehina i drugih farmaceutski prihvatljivih polifenolnih soli i/ili njihovih smjesa.
30. Postupak za liječenje raka u nekom pojedincu, **naznačen time**, da sadrži stupanj davanja tom pojedincu hranjivog farmaceutskog sastava prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-29.
31. Postupak prema patentnom zahtjevu 30, **naznačen time**, da se rak odabire iz skupine koja se sastoji od raka melanoma, raka dojke, raka debelog crijeva, raka pluća i raka mozga.
32. Postupak za liječenje upalne bolesti u nekom pojedincu, **naznačen time**, da sadrži stupanj davanja tom pojedincu hranjivog farmaceutskog sastava prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1-29.
33. Postupak prema patentnom zahtjevu 32, **naznačen time**, da upalna bolest jest osteoartritis.

SAŽETAK

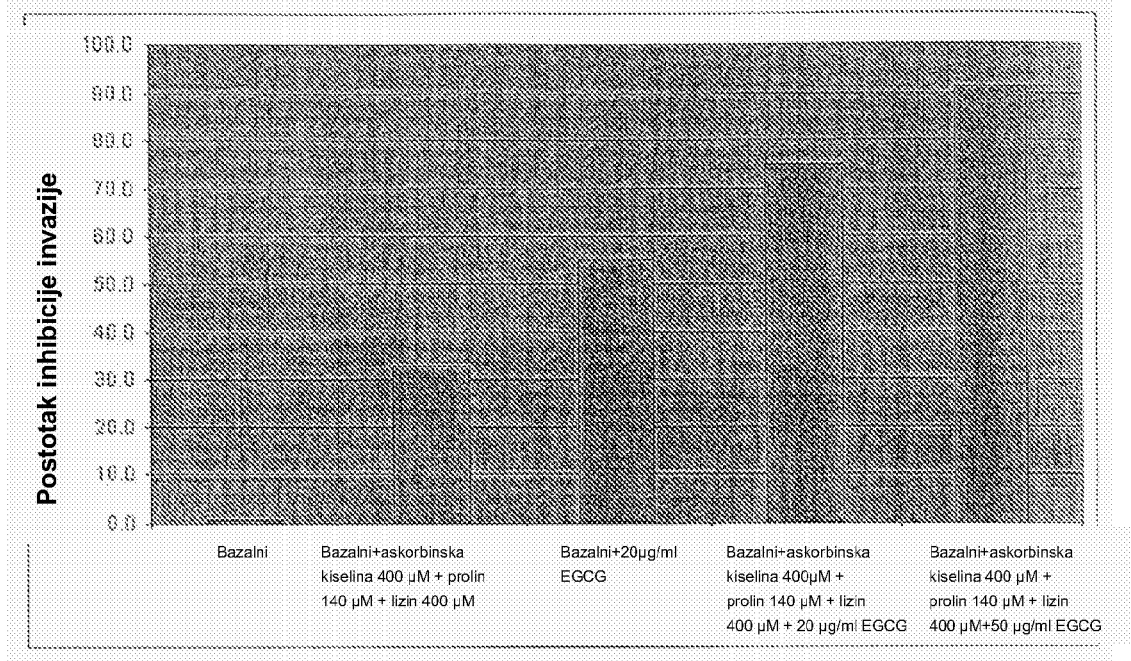
- 40 Hranjivi sastav farmaceutske formulacije koji sadrži askorbinsku kiselinu, L-lizin, L-prolin i barem jedan polifenolni spoj odabran iz skupine koja se sastoji od epigalokatehin galata, epikatehin galata, epigalokatehina, epikatehina i katehina, te se daje uporaba u liječenju raka i drugih tumora. Otkriva se sastav hranjive farmaceutske formulacije EPICAN FORTE™ i postupak njezine uporabe u prevenciji i liječenju raka.

SLIKA 1



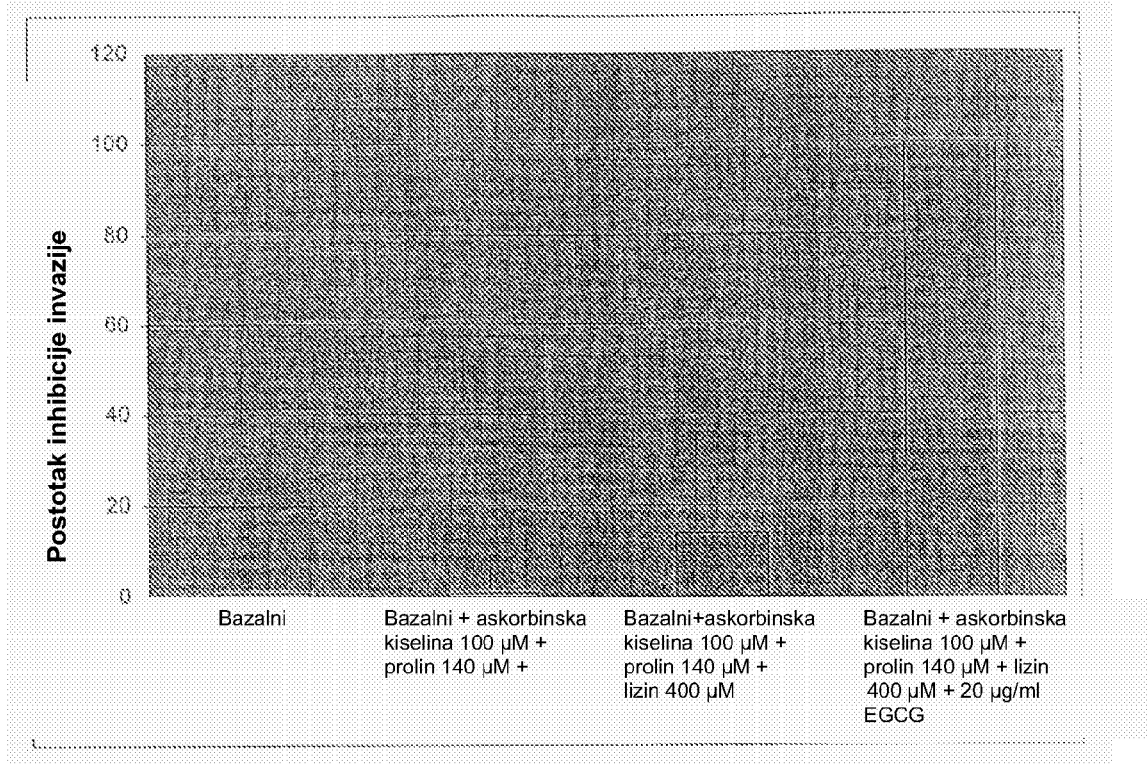
SLIKA 1

SLIKA 2



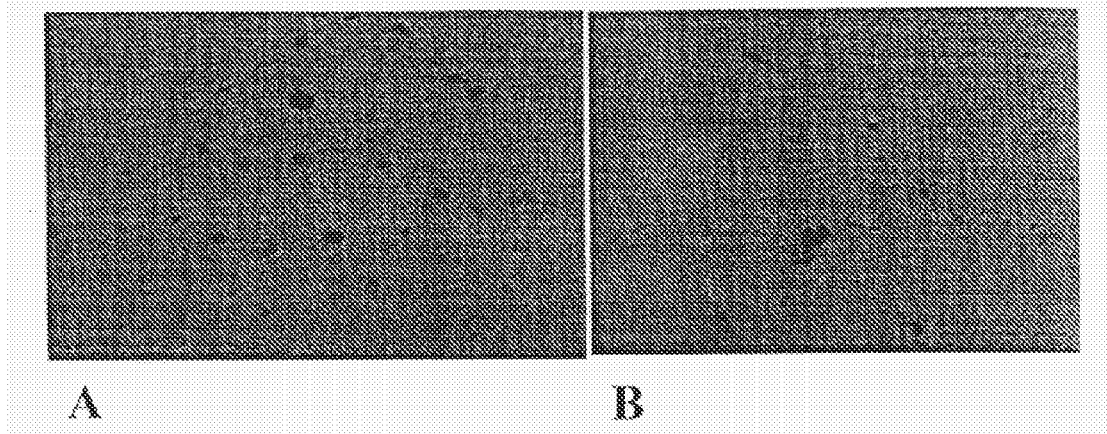
SLIKA 2

SLIKA 3



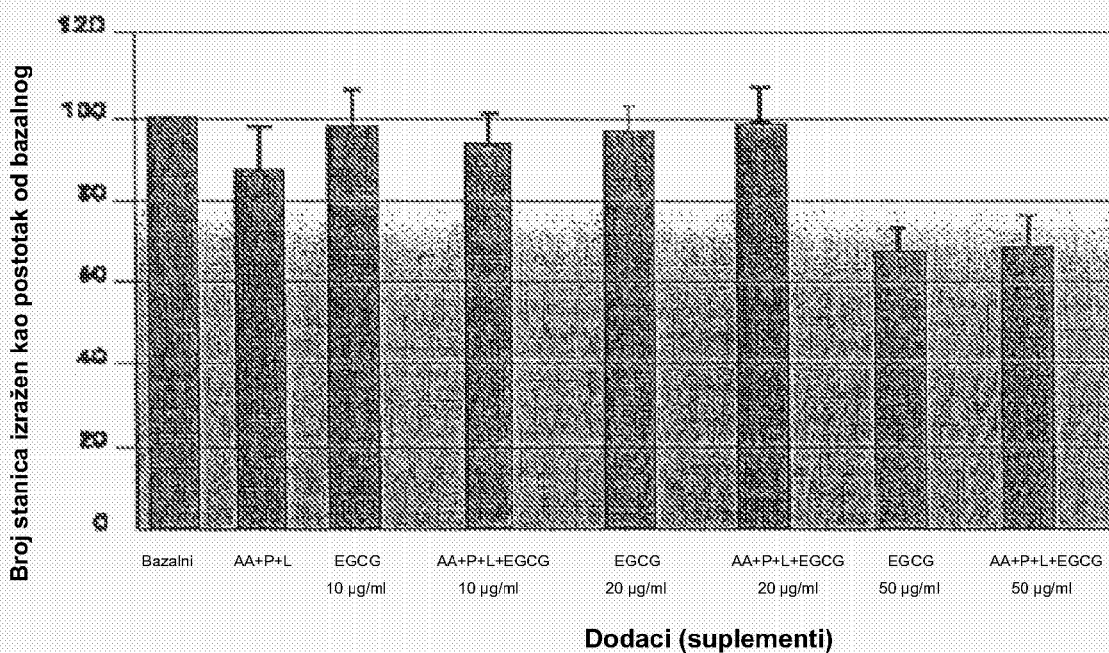
SLIKA 3

5 SLIKA 4



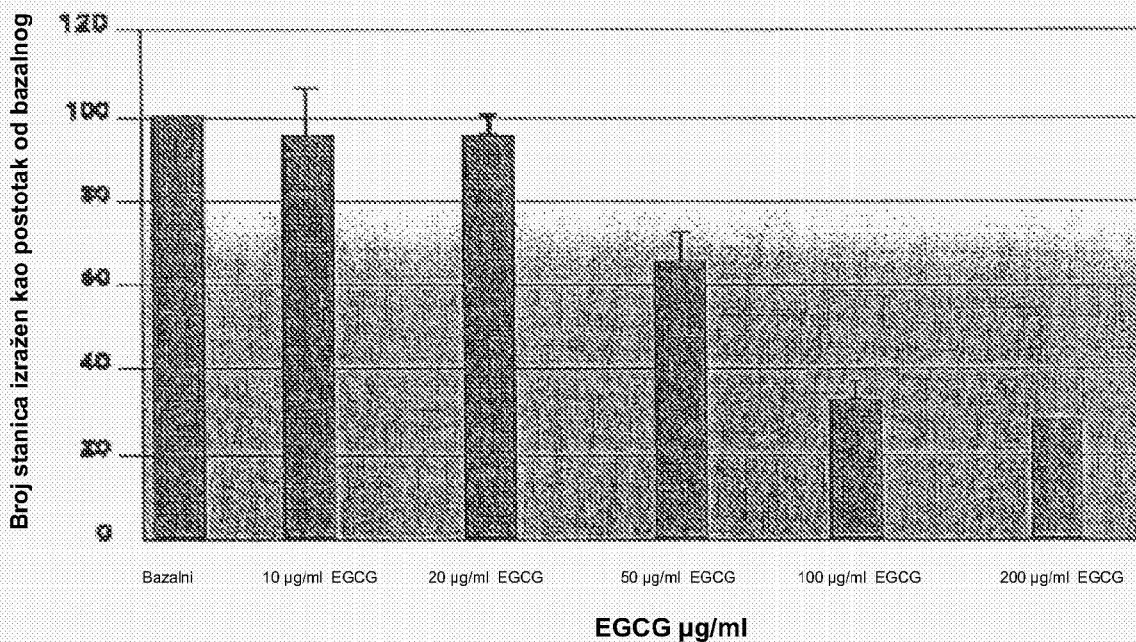
SLIKA 4

MINARIS



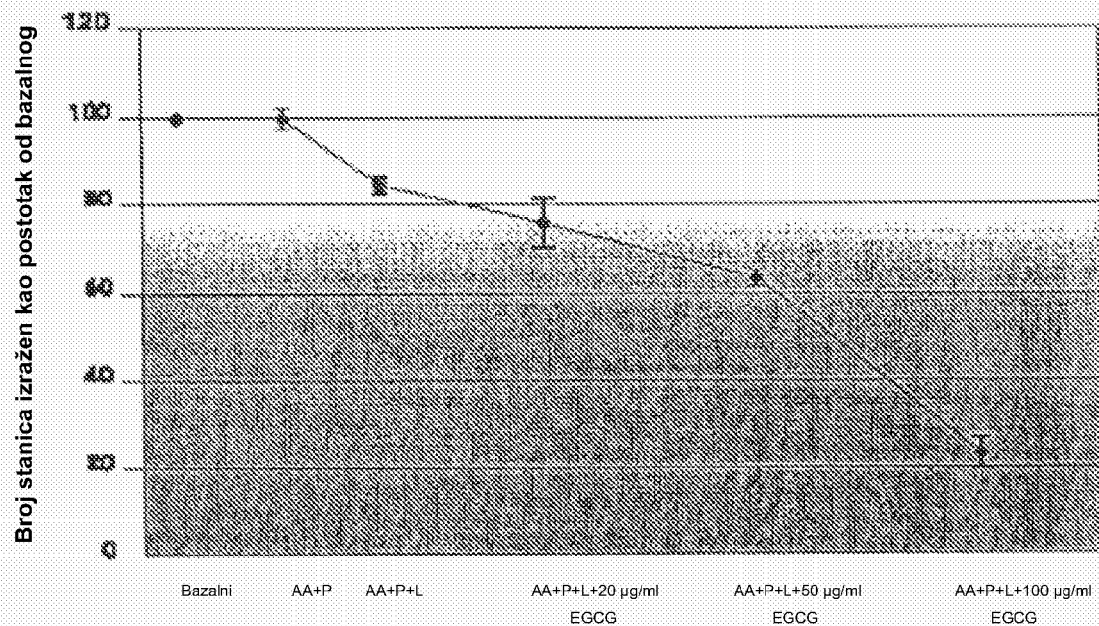
SLIKA 5

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na staničnu proliferaciju stanica melanoma A2058.



SLIKA 6

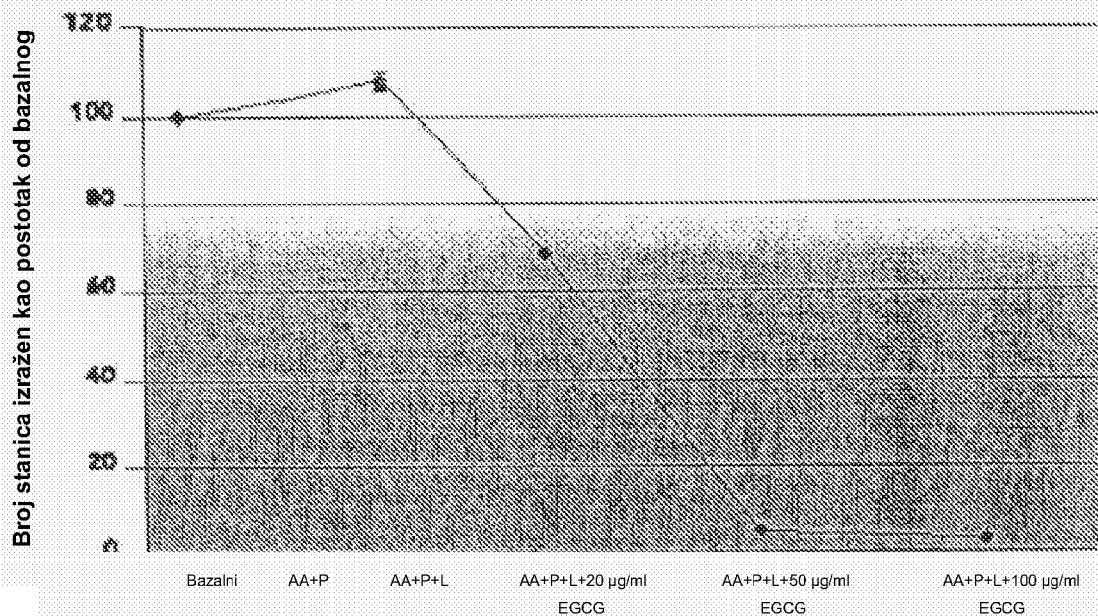
Učinak epigalokatehin galata (EGCG) na staničnu proliferaciju stanica raka dojke MDA-MB 231.



Dodaci (suplementi)

SLIKA 7

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kisline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na staničnu proliferaciju stanica raka dojke MDA-MB 231.

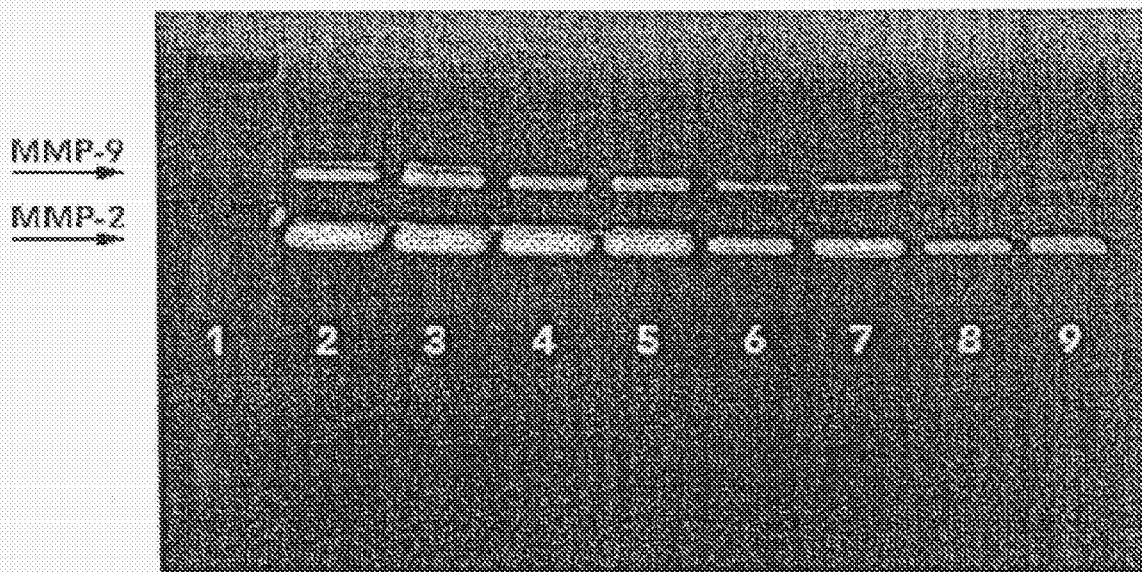


Dodaci (suplementi)

SLIKA 8

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na staničnu proliferaciju stanica raka debelog crijeva HCT116.

SLIKA 9



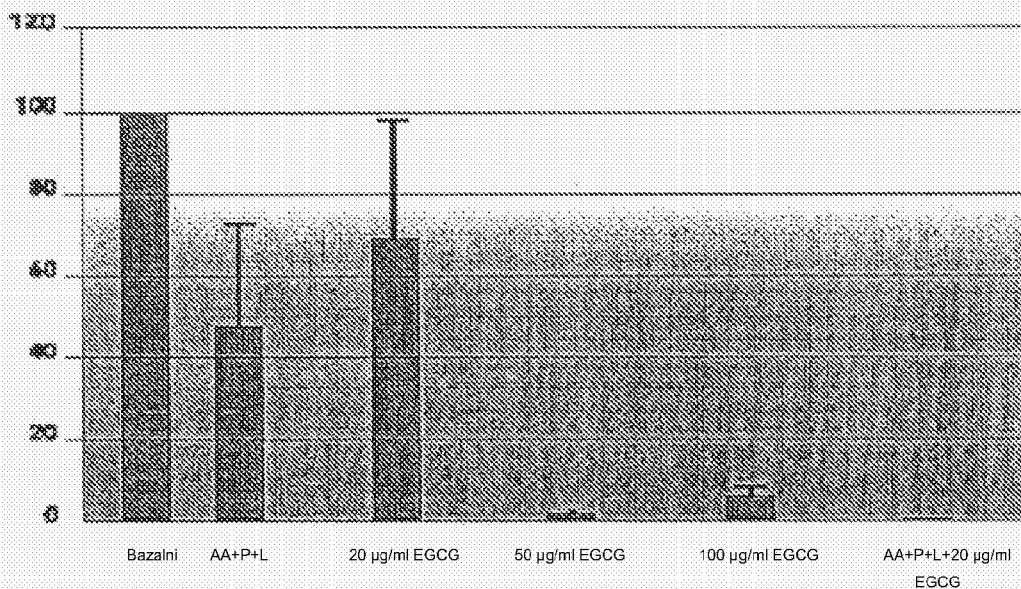
Dodaci (suplementi)

SLIKA 9

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMP) stanicama melanoma.

1. Markeri; 2. Bazalni; 3. AA+P+L; 4. EGCG 10 µg/ml; 5. AA+P+L+10 µg/ml EGCG; 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.

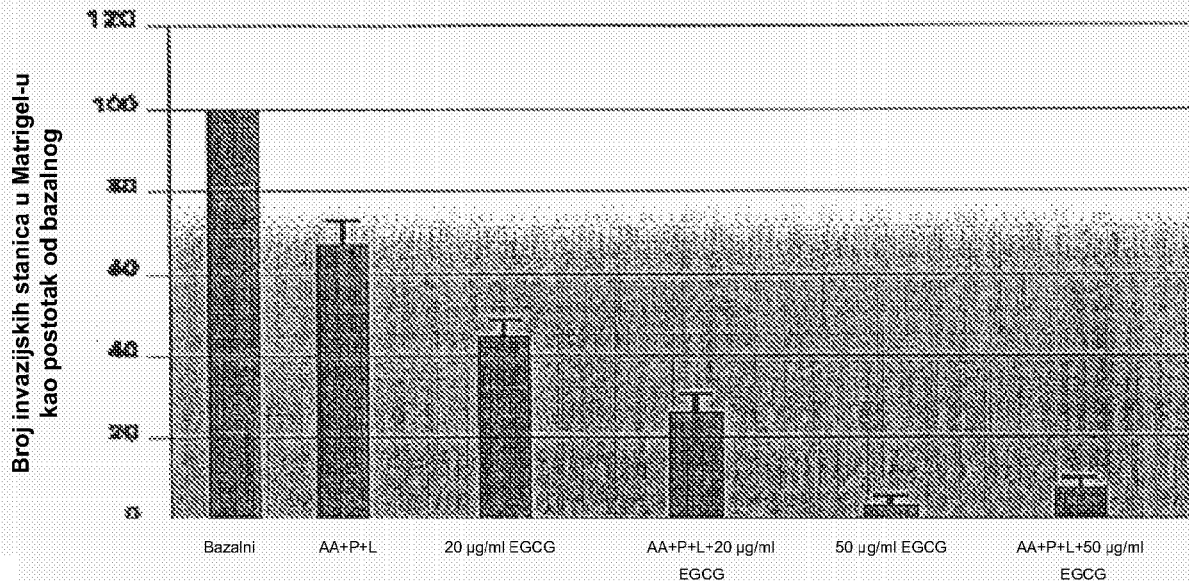
Broj invazijskih stanica u Matrigel-u izražen kao postotak od bazalnog



Dodaci (suplementi)

SLIKA 10

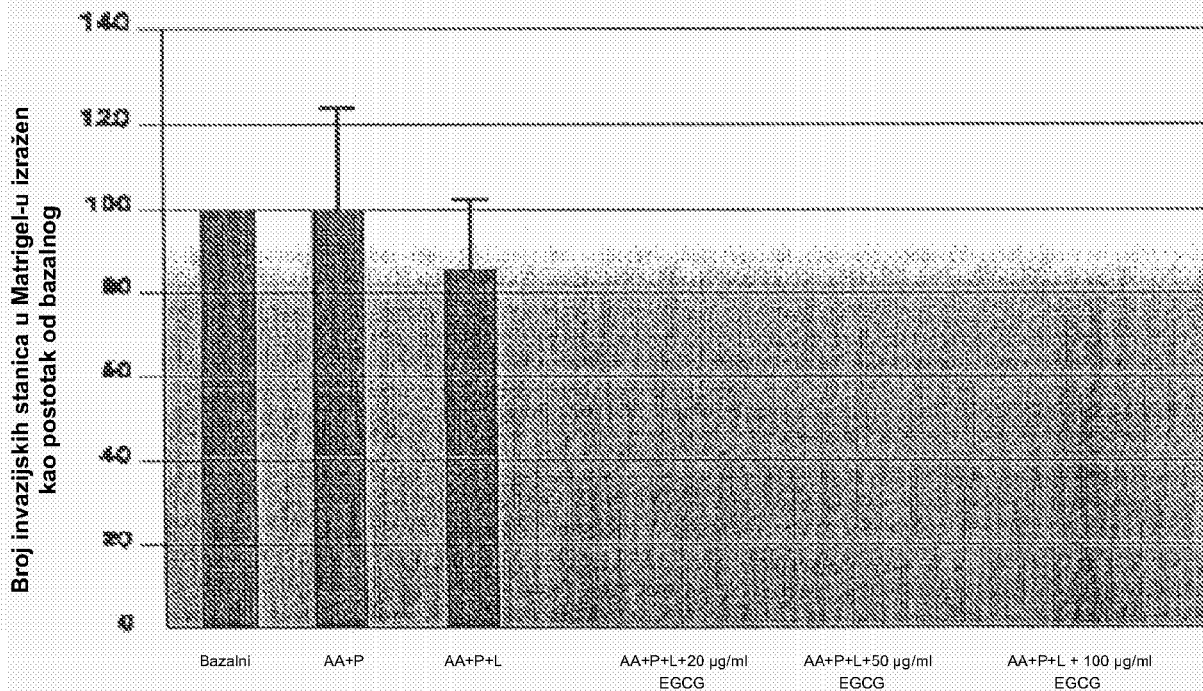
Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na invaziju stanica raka dojke MDA-MB 231 u Matrigel.



Dodaci (suplementi)

SLIKA 11

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na invaziju stanica raka debelog crijeva HCT116 u Matrigel.



Dodaci (suplementi)

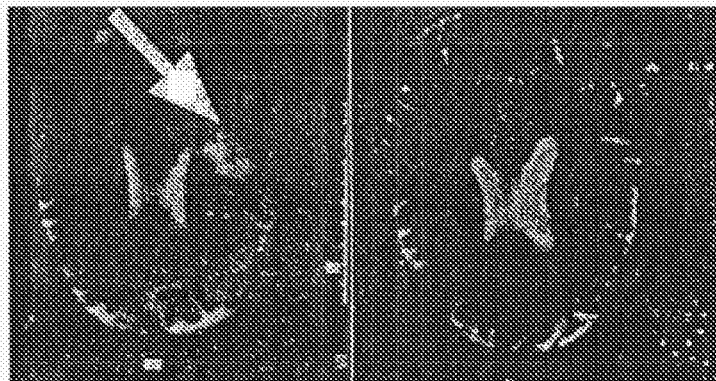
SLIKA 12

Učinak suplementiranja bazalnog medija sa 100 µM askorbinske kiseline (AA), 140 µM prolina (P), 400 µM lizina (L) i različitim koncentracijama epigalokatehin galata (EGCG) na Matrigel.

SLIKA 13/14

12. rujna 2001.

22. kolovoza 2002.



SLIKA 13 prikazuje CT skeniranje



SLIKA 14 prikazuje CT skeniranje