

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03802062.9

[51] Int. Cl.

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年4月2日

[11] 授权公告号 CN 100377706C

[22] 申请日 2003.1.13 [21] 申请号 03802062.9  
[30] 优先权

[32] 2002.1.11 [33] US [31] 60/348,143

[86] 国际申请 PCT/EP2003/000236 2003.1.13

[87] 国际公布 WO2003/057201 英 2003.7.17

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.9

[73] 专利权人 马蒂亚斯·拉特

地址 荷兰阿尔默洛

[72] 发明人 马蒂亚斯·拉特 施里朗·奈克

阿莱克斯圣德拉·尼兹维克

[56] 参考文献

CN1226423A 1999.8.25

审查员 陈晏晏

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 陈轶兰

权利要求书1页 说明书23页 附图9页

[54] 发明名称

包含多酚的营养药物制剂及在制备治疗癌症  
药物中的用途

[57] 摘要

本发明提供了一种营养药物制剂组合物，包含抗坏血酸、L-赖氨酸、L-脯氨酸和至少一种选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素、儿茶素的多酚化合物，及其治疗癌症和其它肿瘤的应用。公开了一种营养药物制剂组合物 EPICANFORTE™ 及其用于预防和治疗癌症的方法。

1. 包含以下成分的组合用于制备治疗个体癌症的药物的用途：(a) 抗坏血酸化合物；(b) 由 L-赖氨酸、L-脯氨酸和 N-乙酰半胱氨酸组成的氨基酸和氨基酸衍生物的组合；和 (c) 选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素和儿茶素的至少一种多酚化合物，其中 (a) 和 (b) 的化合物增强所述多酚化合物阻断癌症增殖和转移的活性，其中所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、脑癌和前列腺癌。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌和脑癌。

## 包含多酚的营养药物制剂及在制备治疗癌症药物中的用途

### 相关申请的交叉参考

本申请依据 35 U.S.C.§119(e)要求 2002 年 1 月 11 日提交的美国临时申请序列号 No.60/348,143 的优先权，其内容在此全部引入作为参考。

### 发明领域

本发明涉及一种营养药物制剂及其用于治疗癌症的用途。更具体而言，本发明涉及含有多酚的药物制剂，其含有有效量的多酚，用于治疗癌症。本发明的制剂用作预防和治疗癌症的药剂，包含抗坏血酸、赖氨酸、脯氨酸和至少一种选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素和儿茶素的多酚化合物。

### 发明背景

癌症是工业化世界中的主导死因之一。不存在对癌症的特异性和病因治疗，癌症的死亡率是所有疾病中最高的之一。最为广泛使用的疗法 - 化疗和放疗 - 不能区分健康组织和癌症，并伴随严重的副作用。因此，需要对癌症的选择性治疗。

癌细胞用于扩增并在体内转移的关键机制之一涉及对周围的结缔组织的酶促破坏。通过特异性药物控制这一过程的治疗方法未取得成功，目前没有可利用的方法来控制癌症转移。目前化疗和放疗的治疗方案集中于在体内破坏癌细胞，而不解决转移问题。此外，这些治疗是有毒性的、非特异性的并且伴随严重的副作用。化疗和放疗携带发生新癌症的危险，并且通过其破坏体内的结缔组织可促进癌症侵袭。

为了生长并扩展到身体的其它部分，癌细胞通过多种基质金属蛋白酶 (MMP) 和纤溶酶降解胞外基质，所述酶的活性与肿瘤生长的攻击性相关。Rath 和 Pauling (1992) 假设营养物质如氨基酸赖氨酸和抗坏血酸可作用为胞外基质蛋白水解的天然抑制物，由此它们具有调

节肿瘤生长和扩展的潜能。这些营养物质可通过数种机制发挥其抗肿瘤潜能,其中有抑制 MMP 和加强癌细胞周围的结缔组织(肿瘤“包囊”效应)。

美国专利 No. 5,962,517 公开了一种用于不同的医学适应症(痤疮治疗)的药物组合物。所公开的组合物包含痤疮减轻成分,至少一种牛蒡根酸模根,或基于儿茶素的组合物;和皮肤细胞调理成分,包含过渡金属。所公开的组合物未显示出在癌症治疗和/或预防中具有任何有益价值。

PCT WO 00/76492 公开了一种含有儿茶素化合物的用于减轻疾病的营养制剂。但是,已显示出儿茶素的生物利用率很低(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)), 并且 PCT WO 00/76492 没有公开增加生物利用率的方法,这在癌症治疗和/或预防中是需要的。

Demeule 等公开了绿茶儿茶素可能对基质金属蛋白酶具有抑制作用。关于在癌症治疗和/或预防中如何使用儿茶素没有提示或教导。鉴于多酚在人体中的生物利用率极低的事实,儿茶素的低组织浓度大大降低了多酚包括表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)的治疗价值。一直需要寻找一种更好的有效治疗肿瘤性疾病和其它疾病包括炎症性疾病的含有多酚的营养药物组合物。

需要可用于控制体内癌症扩展过程的安全并且有效的天然方法。还需要对抗癌症或良性肿瘤在人类中发生的预防性措施,这种措施可应用于患者而无治疗相关副作用的风险。随着近来癌症发病率升高,营养药物组合物已变得受欢迎。对这种组合物的需要将持续并可能增

长。

### 发明概述

本发明的一个目的提供了用于治疗癌症的营养药物组合物,包含:  
a) 抗坏血酸化合物; b) L-赖氨酸化合物; c) L-脯氨酸化合物; 和 d) 至少一种多酚化合物,选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素和儿茶素。a-c)的化合物增强多酚化合物在阻断癌症增殖和转移方面的活性。

优选地,抗坏血酸化合物选自抗坏血酸、药学上可接受的抗坏血酸盐、抗坏血酸酯和/或其混合物。优选地,药学上可接受的抗坏血酸盐是抗坏血酸钙或抗坏血酸镁。更优选地,抗坏血酸酯是棕榈酸抗坏血酸酯。优选地,赖氨酸化合物选自赖氨酸盐酸盐和赖氨酸药学上可接受的赖氨酸盐。优选地,脯氨酸化合物选自脯氨酸盐酸盐和脯氨酸药学上可接受的脯氨酸盐。

在另一个目的中,本发明的营养药物组合物还包含选自硒、铜、锰、钙和镁的微量元素。

在另一个目的中,本发明的营养药物组合物还包含氨基酸。优选地,所述氨基酸是精氨酸。更优选地,本发明的营养药物组合物还包含N-乙酰半胱氨酸。

本发明的另一个目的提供了用于治疗癌症的营养药物组合物,包含:  
a) 抗坏血酸化合物; b) L-赖氨酸化合物; c) L-脯氨酸化合物; d) N-乙酰半胱氨酸; 和 e) 至少一种多酚化合物,选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素和儿茶素。a-d)化合物增强多酚化合物在阻断癌症增殖和转移方面的活性。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物,包含 250 mg 抗坏血酸、250 mg 抗坏血酸钙、250 mg 抗坏血酸镁、250 mg 棕榈酸抗坏血酸酯、1,000 mg 多酚、200 mg N-乙酰-半胱氨酸、1,000 mg 赖氨酸、750 mg 脯氨酸、500 mg 精氨酸、30 mcg 硒、2 mg 铜和 1 mg 锰。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物，包含 25 mg 抗坏血酸、25 mg 抗坏血酸钙、25 mg 抗坏血酸镁、25 mg 棕榈酸抗坏血酸酯、200 mg 多酚、10 mg N-乙酰-半胱氨酸、50 mg 赖氨酸、25 mg 脯氨酸、50 mg 精氨酸、1 mcg 硒、20 mcg 铜和 50 mcg 锰。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物，包含 5,000 mg 抗坏血酸、5,000 mg 抗坏血酸钙、5,000 mg 抗坏血酸镁、5,000 mg 棕榈酸抗坏血酸酯、5,000 mg 多酚、1,500 mg N-乙酰-半胱氨酸、5,000 mg 赖氨酸、3,000 mg 脯氨酸、3,000 mg 精氨酸、200 mcg 硒、9 mg 铜和 10 mg 锰。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物，包含 250 mg 抗坏血酸、250 mg 抗坏血酸钙、250 mg 抗坏血酸镁、250 mg 棕榈酸抗坏血酸酯、1,000 mg 多酚、200 mg N-乙酰-半胱氨酸、1,000 mg 赖氨酸、750 mg 脯氨酸、500 mg 精氨酸、100 mcg 硒、2 mg 铜、1 mg 锰、500 mg 钙和 400 mg 镁。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物，包含 250 mg 抗坏血酸、250 mg 抗坏血酸钙、250 mg 抗坏血酸镁、250 mg 棕榈酸抗坏血酸酯、1,000 mg 多酚、200 mg N-乙酰-半胱氨酸、1,000 mg 赖氨酸、750 mg 脯氨酸、500 mg 精氨酸、100 mcg 硒、2 mg 铜、1 mg 锰、500 mg 钙、400 mg 镁和 200 柑桔生物类黄酮。

本发明的又一个目的提供了一种用于治疗癌症的营养药物组合物，包含：L-赖氨酸、L-脯氨酸、L-精氨酸、抗坏血酸、钙、镁、多酚、N-乙酰-半胱氨酸、硒、铜和锰。

本发明的另一个目的提供了一种营养药物组合物，包含 1,000 mg L-赖氨酸、750 mg L-脯氨酸、500 mg L-精氨酸、710 mg 抗坏血酸、22 mg 钙、50 mg 镁、1,000 mg 多酚、200 mg N-乙酰半胱氨酸、30 mcg 硒、2 mg 铜和 1 mg 锰。

本发明的另一个目的提供了一种治疗个体的癌症的方法，包括向个体施用所公开的营养药物组合物的步骤。优选地，所述癌症选自黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌和脑癌。

本发明的另一个目的提供了一种治疗个体的炎性疾病的方法，包括向个体施用所公开的营养药物组合物的步骤。优选地，所述炎性疾病是骨关节炎。

#### 附图简述

图 1 描述了多酚、抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸对人乳腺癌细胞的迁移行为的抑制作用。

图 2 描述了多酚、抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸对人结肠癌细胞的迁移行为的抑制作用。

图 3 描述了多酚、抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸对人黑素瘤细胞的迁移行为的抑制作用。

图 4 描述了多酚、抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸对人黑素瘤细胞的凋亡的抑制作用。

图 5 描述了抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸和不同量的 EGCG 对人黑素瘤细胞 (A 2058) 的细胞增殖的抑制作用。

图 6 描述了 EGCG 对人乳腺癌细胞 (MDA-MB 231) 的细胞增殖的抑制作用。

图 7 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不同量的 EGCG 对人乳腺癌细胞 (MDA-MB 231) 的细胞增殖的作用。

图 8 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不同量的 EGCG 对人结肠癌细胞 (HCT 116) 的细胞增殖的作用。

图 9 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不同量的 EGCG 对人黑素瘤细胞中基质金属蛋白酶 (MMP) 的表达的作用。

图 10 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不同量的 EGCG 对人乳腺癌细胞 (MDA-MB 231) 侵袭 Matrigel 的作用。

图 11 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不同量的 EGCG 对人结肠癌细胞 (HTC 116) 侵袭 Matrigel 的作用。

图 12 描述了向基础培养基中补充抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸及不

同量的 EGCG 对减少人黑素瘤细胞 (A 2058) 中的侵袭细胞数目的作用。

### 发明详述

如本文所用的,“赖氨酸”可与 L-赖氨酸互换使用,“脯氨酸”可与 L-脯氨酸互换使用,“精氨酸”可与“L-精氨酸”互换使用;“维生素 C”可与抗坏血酸互换使用,并可包括抗坏血酸盐或抗坏血酸酯。“MMP”指基质金属蛋白酶,例如 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP7, MMP-8, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11 等。“EGCG”指(-)-表没食子儿茶精-3-没食子酸盐,它是存在于绿茶中的主要多酚成分。“NHDF”指正常人皮肤成纤维细胞,包括人软骨细胞和人基质细胞。

本发明提供了一种营养药物组合物,包含抗坏血酸、赖氨酸、脯氨酸和至少一种多酚化合物。优选地,抗坏血酸化合物选自抗坏血酸、抗坏血酸盐和抗坏血酸酯。优选地,赖氨酸是赖氨酸盐酸盐或药学上可接受的赖氨酸盐。优选地,脯氨酸是脯氨酸盐酸盐或其药学上可接受的脯氨酸盐。

多酚化合物是绿茶提取物。它们还被称为儿茶素。多酚存在于绿茶中,并被提出可提供保护对抗多种疾病包括癌症 (Mukhtar H., Ahmed N. Am. J. Clin. Nutr. 71:1698S-1702S (2000))。在小鼠中口服绿茶增强阿霉素的肿瘤抑制作用。儿茶素的潜在的抗癌活性可能与其对参与癌细胞增殖和其转移的数种因子的作用相关。已知儿茶素在人癌细胞中引起细胞周期停滞 (Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Mukhtar H.J. Natl. Cancer Inst. 89:1881-1886 (1997))。来自绿茶的多酚部分还参与保护对抗炎症和肿瘤诱导的细胞因子。

多酚化合物占绿茶中 30% 干重。它们包括黄烷醇、黄烷二醇、类黄酮和酚酸。黄烷醇是绿茶多酚中最丰富的,并常被称为儿茶素。在绿茶中有 4 种主要的儿茶素: 1) (-)-表儿茶素, 2) (-)-表儿茶素-3-没食子酸盐, 3) (-)-表没食子儿茶精, 和 4) (-)-表没食子儿茶精-3-没食子酸盐 (EGCG)。在儿茶素中, EGCG 是存在于绿茶中的主要多酚成

分。EGCG 是强有效的抗氧化化合物，并可能有助于绿茶的抗癌活性。儿茶素化合物据报道通过阻止血管生成过程而发挥其抗转移活性（Cao Y., Cao R. *Nature* 398:381 (1999)）。EGCG 还显示出干扰尿激酶（u-纤溶酶原激活物）的活性（Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak J.E. *Nature*: 387-567 (1997)），尿激酶是在人癌症中最常表达的酶之一。EGCG 是优选的多酚化合物。

优选地，多酚化合物选自表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素、儿茶素和其它药学上可接受的多酚盐和/或其混合物。

本专利申请的一个主要治疗靶标是防止胞外基质的消化及其恢复。抗坏血酸或其盐（即抗坏血酸盐）对于胶原、弹性蛋白和其它关键胞外基质分子的合成是需要的。

优选地，抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合被用于增强多酚化合物的抗癌活性。更优选地，该组合增强多酚化合物包括表没食子儿茶精没食子酸盐、表儿茶素没食子酸盐、表没食子儿茶精、表儿茶素、儿茶素的方式使得多酚化合物有效减弱癌细胞的侵袭或完全阻断其侵袭。

不受任何理论的束缚，本发明的营养药物制剂含有包括多酚在内的成分的混合物，发现该混合物有效作用于阻断增殖和转移过程。我们发现，本发明的营养制剂组合物显著减弱癌细胞的侵袭或完全阻断癌细胞的转移。因此，该组合物有效防止这些癌细胞的扩散。所要求保护的化合物的治疗应用是对乳腺、结肠和其它器官的癌症的有效、选择性和安全的治疗。优选地，所公开的营养药物组合物可含有共价结合的两种组分。

优选地，营养组合物的效力通过包括已知有益影响癌症和其它肿瘤的生长和侵袭的化合物包括 L-精氨酸和/或含精氨酸的化合物而得以增强。更优选地，使用 N-乙酰-半胱氨酸。更优选地，使用硒盐、铜盐和锰盐，其有效预防和治疗癌症和其它肿瘤。该组合物还可包括一种或多种在三羧酸循环、呼吸链中需要作为辅酶或对于细胞的其它

代谢功能所需要的化合物，其量有效预防和治疗癌症和其它肿瘤。

本发明的营养药物组合物可以以胶囊、片剂、粉末剂、药丸、注射剂、输液、吸入剂、栓剂的形式或其它药学上可接受的载体和/或递送方式施用于患者，用以预防和治疗癌症和其它肿瘤。优选地，所述营养药物组合物作为胶囊、片剂或粉末剂施用。更优选地，其作为胶囊施用。

本发明的营养药物组合物可用于在选择的患者中预防和治疗癌症和其它肿瘤，其中所述肿瘤或癌症位于乳腺、卵巢、宫颈或雌性生殖系统的其它器官、肺、肝脏、皮肤、胃肠系统、脑、骨或身体的其它器官。优选地，该组合物用于肺癌和脑癌。

本发明的营养药物组合物还可用于预防和治疗感染性疾病、动脉粥样硬化、再狭窄、其它心血管疾病和炎性疾病。优选地，所述炎性疾病是骨关节炎。

MMP 介导的纤溶酶活化：推测 MMP 活性可通过纤溶酶介导的机制受到赖氨酸的影响，尽管不排除其它机制。MMP 作为酶原分泌，其活化部分地由纤溶酶介导，并且其完成需要活性形式的 MMP-3。Nagase (1997) 详述的多种 MMP 的活化机制表明，MMP-3 还需要纤溶酶原转化为其活性形式 - 纤溶酶。纤溶酶原活性结合中心具有供赖氨酸特异性附着的位点。因此，赖氨酸通过结合到纤溶酶原活性位点，可干扰纤溶酶原由纤溶酶原激活物活化成为纤溶酶 (Rath 和 Pauling, 1992)。一种合成的赖氨酸类似物 - 止血环酸已被用于通过该机制来抑制纤溶酶诱导的蛋白水解。

由于纤溶酶活性对于诱导几种组织 MMP 是必要的，赖氨酸可干扰纤溶酶原转化为纤溶酶，由此其可抑制几乎所有 MMP 的活化。此外，EGCG 可通过抑制 MMP-2 对胞外基质降解发挥抑制作用。

癌症侵袭和基质的作用：还可能通过增加围绕癌细胞周围的结缔组织的稳定性和强度来影响癌细胞侵袭基质，并促使对肿瘤的“包囊”。这需要优化胶原原纤维的合成和结构，对此在胶原纤维中羟脯氨酸和羟赖氨酸残基的羟化是必要的。抗坏血酸可能对于这些氨基酸的羟化

是必要的。抗坏血酸和 L-赖氨酸通常不在人体中产生；因此，在多种不同的病理阶段中以及通过不充分的膳食，这些营养物质的亚适水平是可能的。尽管脯氨酸可从精氨酸合成，其合成和或羟化在病理状况下可受到影响。由此，已显示转移肿瘤组织的羟脯氨酸含量比非转移肿瘤组织低得多（Chubainskaia 等，1989）。多种降低转移的药物还增加组织的羟脯氨酸含量（Chubinskaia 等，1989）。已发现癌症患者的尿羟脯氨酸含量比健康人或非癌症患者的要高（Okazaki 等，1992）。所有这些发现提示癌细胞对脯氨酸代谢的不利影响和癌症患者中可能的受调节的脯氨酸缺乏。

癌症患者可能抗坏血酸水平不足。抗坏血酸对于恶性细胞系可具有细胞毒性并发挥抗转移作用。本发明公开了抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸和至少一种多酚化合物的组合对癌细胞系发挥强有效的抗增殖和抗转移作用。优选地，本发明的营养药物制剂有效对抗黑素瘤、乳腺癌和结肠癌细胞。更优选地，本发明的药物制剂有效对抗人结肠癌细胞。

多酚化合物（儿茶素）：EGCG 代表绿茶提取物中儿茶素的一种，并对人癌细胞可能具有生长抑制作用。确切的潜在机制并不清楚。本发明公开了包含抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸以及至少一种多酚化合物的营养药物制剂在有效阻断癌细胞增殖和转移方面的惊人的协同作用。

本发明的营养药物组合物有效阻断乳腺、结肠、皮肤（黑素瘤）的癌症和其它形式癌症的侵袭。在该营养制剂中存在的成分是天然存在的化合物；当用于本申请所公开的要求保护的范围内时，它们显示出无毒性副作用。因此，该组合物还可预防性应用，即有效预防体内的癌症和其它肿瘤。

由于病毒细胞和其它侵袭性微生物采用与癌细胞所用相类似的蛋白酶而将感染扩散至全身，本专利所要求保护的组合物可用于有效预防和治疗病毒性疾病和其它感染性疾病。

癌细胞用于侵袭基质的基质金属蛋白酶活化的类似机制也促使动

脉粥样斑块不稳定，导致心肌梗塞和中风。因此，本专利中要求保护的组合物还可用于有效预防和治疗动脉粥样硬化、再狭窄和其它心血管并发症。

癌细胞用于侵袭基质的基质金属蛋白酶的活化是多种炎症病症中的关键要素。因此，本专利中要求保护的组合物还可用于有效预防和治疗疾病，如类风湿性关节炎、肺气肿、过敏、骨关节炎和其它包括炎症方面的病症。

本发明的营养药物组合物可以以片剂、药丸、注射剂、输液、吸入剂、栓剂的形式或其它药学上可接受的载体和/或递送方式提供给患者。

### 实施例

研究了抗坏血酸、赖氨酸、脯氨酸和至少一种多酚化合物在多种人癌细胞系中的抗增殖和抗侵袭潜能。更具体而言，检测了一种绿茶提取物成分（即表没食子儿茶精没食子酸盐（EGCG））。

### 材料和方法

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人结肠癌细胞 HCT 116、人黑素瘤细胞系 A2058 获自 ATCC。正常人皮肤成纤维细胞获自 GICBO。未指示时，使用获自 ATCC 的培养基。

在癌细胞增殖研究中，每种处理重复 8 次。在侵袭试验中，每种处理进行 3 或 4 次重复。

### 细胞增殖研究

在这些研究中， $5 \times 10^4$  乳腺癌细胞生长于 24 孔板中含 10% 胎牛血清（FBS）的 Liebovitz 培养基中。培养基按原样使用（基础）或含指定的补充物。将平板在空气循环温育箱中温育（不补充  $\text{CO}_2$ ）4 天。结肠癌细胞 HCT116 生长于 McCoy's 5A 培养基，并保持在 5%  $\text{CO}_2$  - 空气循环温育箱中。在温育期结束时，去除培养基，并将孔中的细胞用 PBS 洗，然后与 MTT 染料温育 3 小时。向每孔中加入二甲亚砜（DMSO, 1ml）。使加入 DMSO 的平板在室温下静置 15 分钟，同时轻轻振荡，然后在 550nm 测定每孔中溶液的 OD。孔中 DMSO 溶液的

OD<sub>550</sub> 被认为与细胞数目成正比。不含任何补充物的处理（基础）的 OD<sub>550</sub> 被认为是 100。

### Matrigel 侵袭研究

该研究使用在相容的 24 孔板中的 Matrigel (Becton Dickinson) 插入物进行。使用 DMEM 将成纤维细胞接种并生长于平板孔中。当成纤维细胞达到汇合时，去除培养基，并更换 750  $\mu$ l 指定用于处理的培养基。将癌细胞 ( $5 \times 10^4$ ) 悬浮于 250  $\mu$ l 补充试验设计中指定的营养物质的培养基中，并接种于孔中的插入物上。由此，在插入物上和孔中的培养基均含有相同的补充物。然后将带有插入物的平板温育（对于 MDA-MB-231 细胞在空气循环温育箱中，对于结肠癌细胞和黑素瘤细胞在 5% CO<sub>2</sub> 温育箱中）18-20 小时。温育之后，从孔中去除培养基。将插入物的上表面上的细胞用棉签轻轻擦去。已穿透 Matrigel 膜并已迁移到 Matrigel 的下表面上的细胞用 hemacolor 染料 (EM Sciences) 染色，并在显微镜下用肉眼计数。结果进行 ANOVA，检验所有可能的配对的显著性 ( $p < 0.05$ )。

在不同研究中的培养基补充指示浓度的抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸和 EGCG。

### 明胶酶酶谱

在 0.1% 明胶存在下在 10% Novex 预制聚丙烯酰胺凝胶 (Invitrogen) 中进行明胶酶酶谱。加载培养基 (20  $\mu$ l) 并用 tris-glycine SDS 缓冲液进行 SDS-PAGE。在电泳之后，用 5% Triton X-100 将凝胶洗 30 分钟并染色。蛋白标准同时跑电泳，并确定大致的分子量。

### 实施例 1

将 MDA-MB 231 (ATCC) 乳腺癌细胞接种到改进的 Matrigel 侵袭盒 (BD) 中的 Matrigel 插入物上。向孔中加入补充多种药剂（如图 1 所示）的来自正常人皮肤成纤维细胞的条件培养基 (Clonetics)。将盒温育 24 小时，计数已侵入 Matrigel 膜并已迁移到膜的下表面中的细胞。这些数据显示，表没食子儿茶精没食子酸盐和抗坏血酸、脯氨酸与赖氨酸的组合对 MDA-MB 231 人乳腺癌细胞侵袭 Matrigel 和

迁移的抑制作用。

### 实施例 2

将 HTCT116 (ATCC) 人结肠癌细胞接种到在改进的 Matrigel 侵袭盒 (BD) 中的 Matrigel 插入物上。向孔中加入补充多种药剂 (如图 2 所示) 的来自正常人皮肤成纤维细胞的条件培养基 (Clonetics)。将盒温育 24 小时, 计数已侵入 Matrigel 膜并已迁移到膜的下表面中的细胞。这些数据显示, 表没食子儿茶精没食子酸盐和抗坏血酸、脯氨酸与赖氨酸的组合对 HCT116 人结肠癌细胞侵袭 Matrigel 和迁移的抑制作用。

### 实施例 3

将 A2058 (ATCC) 人黑素瘤细胞接种到在改进的 Matrigel 侵袭盒 (BD) 中的 Matrigel 插入物上。向孔中加入补充多种药剂的来自正常人皮肤成纤维细胞的条件培养基 (Clonetics)。将盒温育 24 小时, 计数已侵入 Matrigel 膜并已迁移到膜的下表面中的细胞。这些数据显示, 表没食子儿茶精没食子酸盐和抗坏血酸、脯氨酸与赖氨酸的组合对 A2058 人黑素瘤细胞侵袭 Matrigel 和迁移的抑制作用。

### 实施例 4

在该试验中, 在以下物质的存在下, 将 A2058 (ATCC) 人黑素瘤细胞接种到在改进的 Matrigel 侵袭盒 (BD) 中的 Matrigel 插入物上:

A: 来自正常人皮肤成纤维细胞的条件培养基 (Clonetics) 和

B: 补充如图 4 说明所示的多种营养物质的相同培养基。温育 24 小时后, 在显微镜下检查并计数已侵入 Matrigel 膜并迁移到膜的下表面的细胞。

这些数据显示表没食子儿茶精没食子酸盐和抗坏血酸 + 脯氨酸 + 赖氨酸的组合对 A2058 的凋亡作用。A; 在组织培养基中的人黑素瘤细胞。B: 在含有抗坏血酸 (100  $\mu\text{M}$ )、脯氨酸 (140  $\mu\text{M}$ )、赖氨酸 (400  $\mu\text{M}$ ) 和 EGCG (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的组织培养基中的人黑素瘤细胞。注释: 细胞被破坏。

## 实施例 5

### 癌细胞增殖研究

#### 黑素瘤 A2058 细胞

图 5 显示 10、20 和 50  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 不补充和补充赖氨酸、脯氨酸和抗坏血酸对黑素瘤细胞增殖的影响。赖氨酸、脯氨酸和抗坏血酸以及 10 和 20  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 对细胞增殖均无任何显著影响。但是，50  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 显著减少细胞数目至 30%。对于赖氨酸、脯氨酸和抗坏血酸观察到类似的作用。

#### 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞

在这些试验中，基础培养基补充 0、10、20、50、100 或 200  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG (图 6)。结果显示，与未补充的对照相比，基础培养基中补充 50、100 和 200  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 显著减少细胞数目分别至  $66.1\pm 5.3$ 、 $33.6\pm 2$  和  $29.6\pm 0.8$  %。细胞培养基中高至 20  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 浓度对细胞增殖没有任何显著抑制作用。

我们还研究了抗坏血酸、赖氨酸、脯氨酸和不同浓度的 EGCG 对癌细胞增殖的影响。图 7 显示抗坏血酸、赖氨酸和脯氨酸非显著性地减少细胞数目至  $86.1\pm 1.93$  %。与对照组相比，向该组合中再添加 20、50 和 100  $\mu\text{g}$  的 EGCG 分别显著减少细胞数目至  $74\pm 5.8$ 、 $64.8\pm 1.6$  和  $22\pm 5$  %。

#### 结肠癌 HCT116 细胞

尽管抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸对结肠癌细胞的细胞增殖的抑制作用不显著，抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸与 20  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 的组合显著减少细胞数目至  $69\pm 0.5$  % (图 8)。在该组合中更高水平的 EGCG (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 强烈地减少细胞数目至  $4.6\pm 0.3$  %。

在这些研究中所用的营养组合的抗增殖活性随着癌细胞的类型而不同。在乳腺癌细胞中，抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸与 EGCG 的组合比这些营养物质个别单独使用时具有更高的抗增殖作用。在黑素瘤和结肠癌细胞中，暴露于抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸的组合不影响其增殖。但是，将这些营养物质与 20  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 组合导致结肠癌细

胞数目显著减少，但在黑素瘤细胞中不是这样。对于抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸和 EGCG 的组合，结肠癌细胞表现出比乳腺癌细胞更为敏感，而黑素瘤细胞是最不敏感的。当将抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸与 50  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 一起给予时，结肠癌细胞的增殖几乎完全降低 (4.6%)。

### 实施例 6

#### 明胶酶酶谱研究

EGCG 与基础以及抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸补充对黑素瘤细胞表达 MMP 的影响通过明胶酶酶谱如图 9 所示。黑素瘤细胞显示出相应于 MMP-2 和 MMP-9 的两个条带。与基础相比，抗坏血酸、赖氨酸和脯氨酸组合对 MMP 条带表达没有作用。但是，EGCG 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 和 MMP-9 两者的表达。对于基础以及抗坏血酸、赖氨酸和脯氨酸组合，条带强度相同。

### 实施例 7

#### 胞外基质侵袭和迁移研究

测试了抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合单独使用以及与多种浓度的 EGCG 一起使用的抑制作用。使用常规用于评价多种癌细胞系的侵袭潜能的预制 Matrigel 基质，研究这些组合对胞外基质的作用。

#### 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞

图 10 显示了在抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸存在下温育的乳腺癌细胞的 Matrigel 侵袭结果。与在未补充的培养基中温育的细胞相比，在抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合存在下温育的癌细胞的侵袭降低至  $48.1 \pm 22.1\%$ 。在仅仅补充 20  $\mu\text{g/ml}$  的 EGCG 的培养基中，侵袭细胞的数目减少至  $69.5 \pm 27.4\%$ 。在更高 EGCG 浓度 (50  $\mu\text{g/ml}$  和 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下实现完全抑制乳腺癌细胞对基质的侵袭。

在另一系列的研究中，向培养基中补充 100  $\mu\text{M}$  抗坏血酸降低侵袭达 36%。补充抗坏血酸和 140  $\mu\text{M}$  脯氨酸进一步降低侵袭达 47%。在补充物中除抗坏血酸和脯氨酸还使用 400  $\mu\text{M}$  赖氨酸进一步降低侵袭至 67%；赖氨酸在增强抗坏血酸和脯氨酸的作用方面显示出线性反

应直至 800  $\mu\text{M}$  水平。

图 10 还显示了抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合以及 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 EGCG 有效地完全阻止癌细胞侵袭通过胞外基质。这一组合使得可对癌细胞侵袭实现最大抑制作用而不必使用高浓度的单独营养物质。由此，抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸以及 EGCG 使得可以在较低水平 EGCG (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 完全阻止乳腺癌细胞对基质的侵袭。

#### 结肠癌 HCT116 细胞

图 11 显示抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合显著降低结肠癌细胞的侵袭至  $67.2\pm 3.7\%$ 。以 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  单独使用的 EGCG 降低侵袭至  $44.9\pm 3.3\%$ ，而抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸以及 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 EGCG 的组合具有降低结肠癌细胞侵袭至  $24.9\pm 4.6\%$  的协同作用。

#### 黑素瘤 A2058 细胞

图 12 显示抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸的组合有效减少侵袭细胞数目至  $88.2\pm 4\%$ ，但是这一减少不是统计学显著的。将这些营养物质与少至 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 EGCG 组合有效减少侵袭细胞数目至 0。

结果显示，使用抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸与 EGCG 使得我们能够较低水平 EGCG 获得侵袭和迁移通过 Matrigel 膜的细胞数目的强烈减少。在乳腺癌细胞和黑素瘤细胞中，使用低至 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  水平的 EGCG 与抗坏血酸、脯氨酸和赖氨酸，侵袭被降低至 0。该组合结果的益处对于结肠癌细胞不如用乳腺癌细胞所获得的惊人。EGCG 的水平必须为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  才能将这些细胞的侵袭降低 90%。在这一研究中，没有观察到黑素瘤细胞中 MMP 表达的改变，尽管 EGCG 以剂量依赖性方式对其表达具有抑制作用。

这些系列的研究确定地证实了，包含抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸以及至少一种多酚化合物的本发明的营养药物制剂对癌细胞发挥有效的抗增殖和抗侵袭作用。

#### 实施例 8

以下营养药物制剂 (表 1-5) 和 EPICAN FORTE<sup>TM</sup> (表 6) 举例说明其制备。这些制剂包含抗坏血酸、脯氨酸、赖氨酸和至少一种

多酚化合物，发现其有效阻断癌细胞的侵袭和癌细胞的转移。

表 1. 制剂 1

生物物质	量	%
抗坏血酸	250 mg	5.6
抗坏血酸钙	250 mg	5.6
抗坏血酸镁	250 mg	5.6
棕榈酸抗坏血酸酯	250 mg	5.6
多酚	1,000 mg	22.5
N-乙酰-半胱氨酸	200 mg	4.5
赖氨酸	1,000 mg	22.5
脯氨酸	750 mg	16.8
精氨酸	500 mg	11.2
硒	30 mcg	<0.01
铜	2 mg	0.04
锰	1 mg	0.02

mg = 毫克

mcg = 微克

“%”指各成分相对于制剂总重的%重量

表 2. 制剂 2

生物物质	量	%
抗坏血酸	25 mg	5.7
抗坏血酸钙	25 mg	5.7
抗坏血酸镁	25 mg	5.7
棕榈酸抗坏血酸酯	25 mg	5.7
多酚 - 50 %	200 mg	46.0
N-乙酰-半胱氨酸	10 mg	2.3
赖氨酸	50 mg	11.5
脯氨酸	25 mg	5.7
精氨酸	50 mg	11.5
硒	1 mcg	<0.001
铜	20 mcg	<0.001
锰	50 mcg	<0.001

mg = 毫克

mcg = 微克

“%”指各成分相对于制剂总重的%重量

表 3. 制剂 3

生化物质	量	%
抗坏血酸	5,000 mg	13.3
抗坏血酸钙	5,000 mg	13.3
抗坏血酸镁	5,000 mg	13.3
棕榈酸抗坏血酸酯	5,000 mg	13.3
多酚 - 100 %	5,000 mg	13.3
N-乙酰-半胱氨酸	1,500 mg	4.0
赖氨酸	5,000 mg	13.3
脯氨酸	3,000 mg	8.0
精氨酸	3,000 mg	8.0
硒	200 mcg	<0.001
铜	9 mg	0.02
锰	10 mg	0.002

mg = 毫克

mcg = 微克

“%”指各成分相对于制剂总重的%重量

表 4. 制剂 4

生化物质	量	%
抗坏血酸	250 mg	4.7
抗坏血酸钙	250 mg	4.7
抗坏血酸镁	250 mg	4.7
棕榈酸抗坏血酸酯	250 mg	4.7
多酚 - 98 %	1,000 mg	18.7
N-乙酰-半胱氨酸	200 mg	3.7
赖氨酸	1,000 mg	18.7
脯氨酸	750 mg	14.0
精氨酸	500 mg	9.3
硒	100 mcg	<0.002
铜	2 mg	0.04
锰	1 mg	0.02
钙	500 mg	9.3
镁	400 mg	7.5

mg = 毫克

mcg = 微克

“%”指各成分相对于制剂总重的%重量

表 5. 制剂 5

生化物质	量	%
抗坏血酸	250 mg	4.5
抗坏血酸钙	250 mg	4.5
抗坏血酸镁	250 mg	4.5
棕榈酸抗坏血酸酯	250 mg	4.5
多酚 - 98 %	1,000 mg	18
N-乙酰-半胱氨酸	200 mg	3.6
赖氨酸	1,000 mg	18
脯氨酸	750 mg	13.5
精氨酸	500 mg	9
硒	100 mcg	<0.002
铜	2 mg	<0.04
锰	1 mg	<0.02
钙	500 mg	9
镁	400 mg	7.2
柑桔生物类黄酮	200 mg	3.6

mg = 毫克

mcg = 微克

“%”指各成分相对于制剂总重的%重量

表 6. EPICAN FORTE™ 的配方

一份服用量：6 粒胶囊（建议用法：2 粒胶囊×3 次/天，优选进餐时服用）

6 粒胶囊含有：	每份中的量	% 每日数值
L-赖氨酸	1,000 mg	
L-脯氨酸	750 mg	
L-精氨酸	500 mg	
维生素 C(作为抗坏血酸、抗坏血酸钙、抗坏血酸镁和棕榈酸抗坏血酸酯)	782 mg	1180%
钙 (来自抗坏血酸钙)	22 mg	2%
镁 (来自抗坏血酸镁)	50 mg	12%
标准绿茶提取物(叶)(80%多酚 - 800 mg) 去咖啡因的	1,000 mg	
N-乙酰-半胱氨酸	200 mg	
硒 (来自 L-硒代甲硫氨酸)	30 mg	43%
铜 (来自氨基乙酸铜)	2 mg	100%
锰 (来自柠檬酸锰)	1 mg	50%

mg = 毫克

mcg = 微克

EPICAN FORTE™ 是一项待审的美国申请中的商标名。

其它成分：Vegetarian 胶囊（羟丙基甲基纤维素）、二氧化硅、纤维素和硬脂酸镁。

#### 实施例 9

#### EPICAN FORTE™ 对人癌细胞的作用

研究了 EPICAN FORTE™ 对人癌细胞的作用。研究了转移参数如基质金属蛋白酶 (MMP) 的表达 (通过明胶酶酶谱)、通过 Matrigel 的侵袭潜能和增殖/生长 (通过 MTT 测定)。这些试验的方案如以上详细描述。使用了几种人癌细胞系：皮肤癌 - 黑素瘤细胞 2058, 肝癌 - HepG2 细胞, 纤维肉瘤 - HT 1080 细胞, 结肠癌 - HCT 116, 乳腺癌

## ER+/- MCF-7 和乳腺癌 ER-/- MDA-MB-231。

以下表格（表 7 和 8）总结了结果：

### EPICAN FORTE™ 对人癌细胞系增殖/生长的作用

表 7. 治疗剂量的 EPICAN FORTE™ (µg/ml): 对照的百分比

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

### EPICAN FORTE™ 对人癌细胞侵袭 Matrigel 和迁移的作用

表 8. 治疗剂量的 EPICAN FORTE™ (µg/ml): 百分比抑制

癌细胞	0	10	50	100	500	1000
黑素瘤	0%	80	98	100	-	-
Hep G2	0%	15	25	50	95	100
HT-1080	0%	90	-	50	70	100
结肠(HCT 116)	0%	20	50	80	100	-
MDA-MB-231	0%	50	-	98	-	-
MCF-7	非侵袭					

EPICAN FORTE™ 对人癌细胞系表达基质金属蛋白酶 (MMP) 的影响

黑素瘤细胞：在明胶酶酶谱上黑素瘤细胞展示出两个条带，相应于 MMP-2 和 MMP-9。EPICAN FORTE™ 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 和-9 的表达。MMP-2 和-9 的表达被浓度为 100 µg/ml 的 EPICAN FORTE™ 显著抑制，并且在浓度为 1000 µg/ml 时几乎检测不出。

HepG2 细胞：象黑素瘤细胞一样，HepG2 细胞也表达相应于 MMP-2 和 MMP-9 的两个条带。EPICAN FORTE™ 在 500 和 1000

µg/ml 浓度抑制 MMP-2 和-9 的表达。

**纤维肉瘤 HT-1080:** HT-1080 细胞展示出 MMP-2 和-9 的两个条带。EPICAN FORTE™ 也以剂量依赖性方式抑制这两个条带的表达。在 500 和 1000 µg/ml 浓度看到的条带非常微弱。

**结肠癌 HCT 116:** 结肠癌细胞在酶谱上仅仅显示一个条带，相应于 MMP-2，其在 100 µg/ml 浓度完全消失。

**MCF-7 和 MDA-MB-231:** 在我们的试验浓度下这些癌细胞系没有显示任何 MMP 条带，所述试验浓度与其它癌细胞系相类似。

MDA-MB-231 通过 Matrigel 的侵袭分别被 10、50 和 100 µg/ml 的 EPICAN FORTE™ 抑制 50、60 和 95%。EPICAN FORTE™ 在 10 µg/ml 对 MDA-MB-231 没有毒性，在 100 µg/ml 显示出轻微的毒性。但是，其在 1000 µg/ml 表现出显著的毒性。MMP-2 和 MMP-9 均未由酶谱表达。相比之下，EPICAN FORTE™ 甚至在 500 µg/ml 对 MCF-7 也无毒性，在 1000 µg/ml 表现出轻微的毒性。MCF-7 不是侵袭性的并且不表达 MMP 活性。

EPICAN FORTE™ 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达。MMP-2 和 MMP-9 的表达被浓度为 100 µg/ml 的 EPICAN FORTE™ 显著抑制，在 100 µg/ml 的浓度几乎检测不出。以 10 和 100 µg/ml 浓度使用的 EPICAN FORTE™ 不显著影响细胞存活力，在 100 µg/ml 其显示出 10 - 40% 范围的细胞毒性，取决于细胞类型。黑素瘤细胞、MDA-MB-231 细胞和黑素瘤细胞与 NHDF 的共培养物通过 Matrigel 的侵袭以剂量依赖性方式被显著降低。HT-1080 细胞通过 Matrigel 的侵袭在 10、100、200 和 1000 µg/ml 分别被抑制 10%、50%、70% 和 100%。有趣的是，EPICAN FORTE™ 在 100 µg/ml 对 HT-1080 细胞没有毒性。这些结果证实，EPICAN FORTE™ 对于几种癌细胞系以及在共培养中是非常有效的。这些观察结果揭示，EPICAN FORTE™ 可提供天然的治疗基础，这使其成为治疗人类癌症的有价值并且有希望的候选物。

#### 实施例 10

### EPICAN FORTE™ 对人正常细胞系的影响

研究了 EPICAN FORTE™ 对正常人细胞的影响。采用了类似于癌细胞系的参数；即，酶谱用于 MMP 表达，通过 Matrigel 的侵袭和增殖/生长（通过 MTT 测定）。使用了几种正常人皮肤成纤维细胞（NHDF），包括：人软骨细胞和人基质细胞。

以下表格（表 9、10 和 11）总结了 EPICAN FORTE™ 对正常人细胞的增殖/生长、转移侵袭和 MMP 产生的影响：

表 9. EPICAN FORTE™ 对正常人细胞的增殖/生长的影响。

EPICAN FORTE™ 的治疗剂量 ( $\mu\text{g/ml}$ ): 对照的百分比

正常细胞	0	10	50	100	500	1000
NHDF	100%	118	-	135	-	90
软骨细胞	100%	113	-	148	76	82
基质细胞	100%	100	116	115	98	64

表 10. EPICAN FORTE™ 对正常人细胞侵袭 Matrigel 的影响。

EPICAN FORTE™ 的治疗剂量 ( $\mu\text{g/ml}$ ): 百分比抑制

正常细胞	0	10	50	100	500	1000
NHDF	0%	67%	89%	100%	-	-
软骨细胞	0%	45%	85%	95%	100%	-
基质细胞	0%	0%	-	95%	100%	

EPICAN FORTE™ 对正常人细胞表达基质金属蛋白酶（MMP）的影响总结如下：

**NHDF:** 在酶谱上 NHDF 仅仅表达一个相应于 MMP-2 的条带，其在 1000  $\mu\text{g/ml}$  浓度的 EPICAN FORTE™ 几乎消失。

**软骨细胞:** 软骨细胞也仅显示出一个相应于 MMP-2 的条带。EPICAN FORTE™ 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 的表达。MMP-2 的表达在 100  $\mu\text{g/ml}$  的 EPICAN FORTE™ 浓度被显著抑制，在 200  $\mu\text{g/ml}$  浓度的 EPICAN FORTE™ 完全消失。

**基质细胞:** 基质细胞也仅展现一个相应于 MMP-2 的条带。EPICAN FORTE™ 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 的表达。在 50 和

100 µg/ml 浓度看到非常微弱的条带，其在 200 和 500 µg/ml 浓度未检测出。

总之，所述结果表明，EPICAN FORTE™ 以剂量依赖性方式抑制 MMP-2 的表达。MMP-2 的表达在 100 µg/ml 浓度的 EPICAN FORTE™ 被显著抑制，在 200 µg/ml 浓度几乎检测不到。此外，还发现软骨细胞通过 Matrigel 的侵袭在 10 µg/ml、100 µg/ml 和 200 µg/ml 被抑制 50%、85% 和 95%。在 500 µg/ml，侵袭被完全降低至 0%。

EPICAN FORTE™ 对软骨细胞无毒性，甚至是在 200 µg/ml 的浓度。事实上，EPICAN FORTE™ 发挥细胞增殖作用，200 µg/ml 使得细胞增殖增加 70%，超过对照 70%。仅在 500 µg/ml 看到轻微的毒性作用。这些结果证实，EPICAN FORTE™ 在抑制 MMP-2 表达方面有效，并且在骨关节炎和包括过度软骨降解的其它相关疾病中，EPICAN FORTE™ 代表一种新的抗炎营养制剂，作为天然途径来抑制 MMP 产生和胞外基质降解。

尽管 Epican-Forte 的体内测试方面才刚刚开始进行，已报道了两个病例，证实 Epican-Forte 作为药物治疗癌症的有效性。

一名被诊断患有脑肿瘤的女性患者接受化疗和放疗未取得成功，在 2002 年 4 月底，她放弃了治疗。偶然地，她开始接受用 Epican-Forte 按照推荐的剂量进行治疗。在 2002 年 8 月底，MRT 显示肿瘤消失了。

一名 64 岁男性患者，在 2002 年 5 月其肿瘤标志 PSA 水平显著升高 (59,9 µg/l)，被诊断为沿主动脉的淋巴管有前列腺癌转移。他开始按推荐剂量用 Epican-Forte 治疗。3 个月后，PSA 水平降至 0,9 µg/l。在 2002 年 10 月底的 CT 检查显示，先前可见的淋巴转移不再明显，并且其前列腺大小正常。

已描述了本发明的多种实施方案。然而，应理解可以作出多种变动而不偏离本发明的实质和范围。

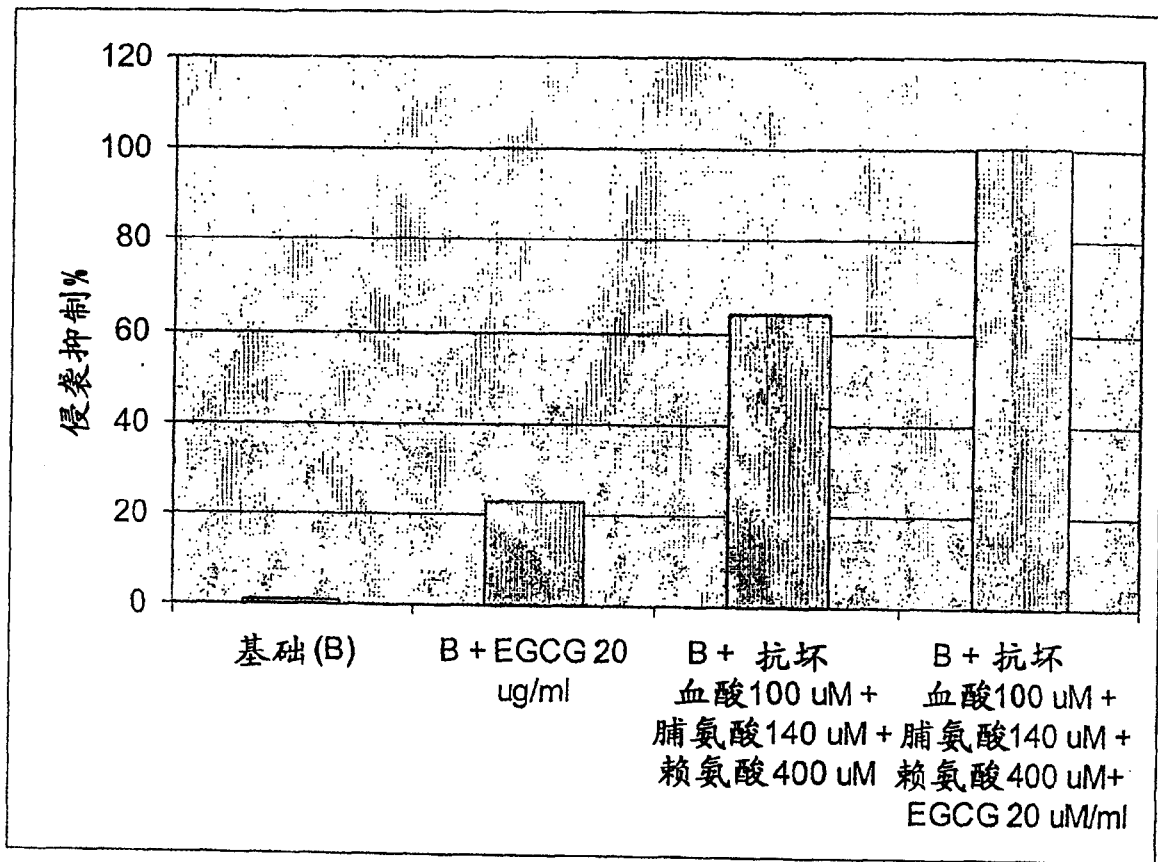


图1

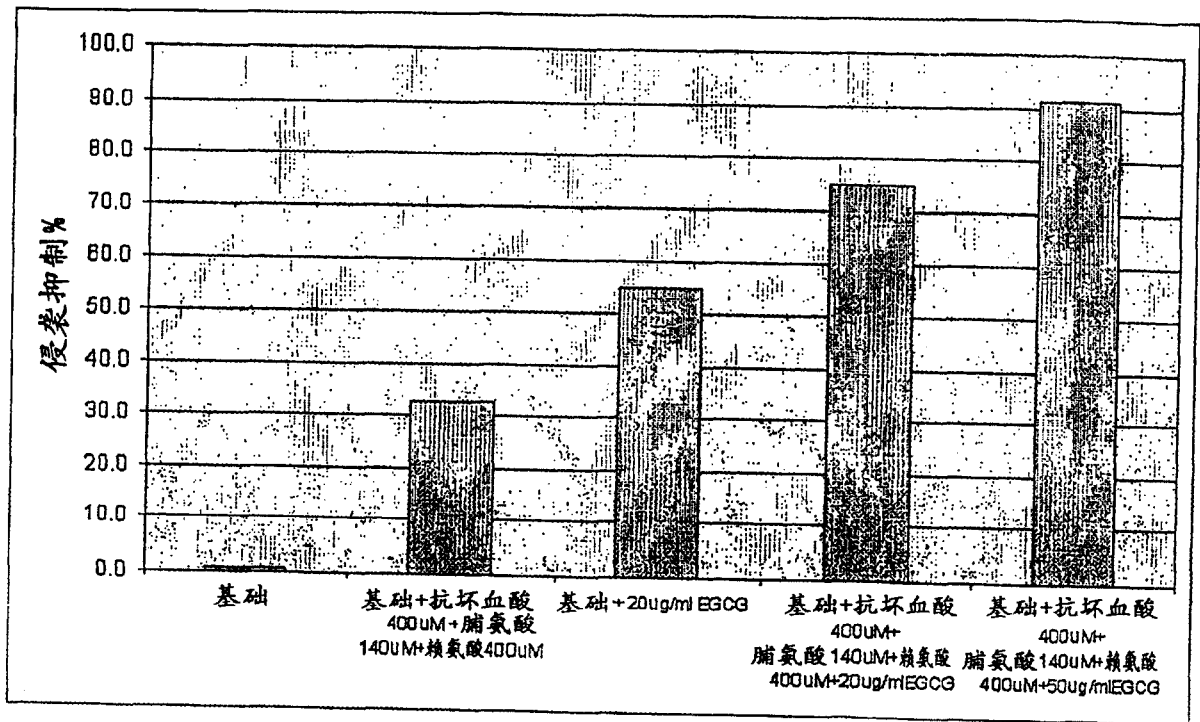


图 2

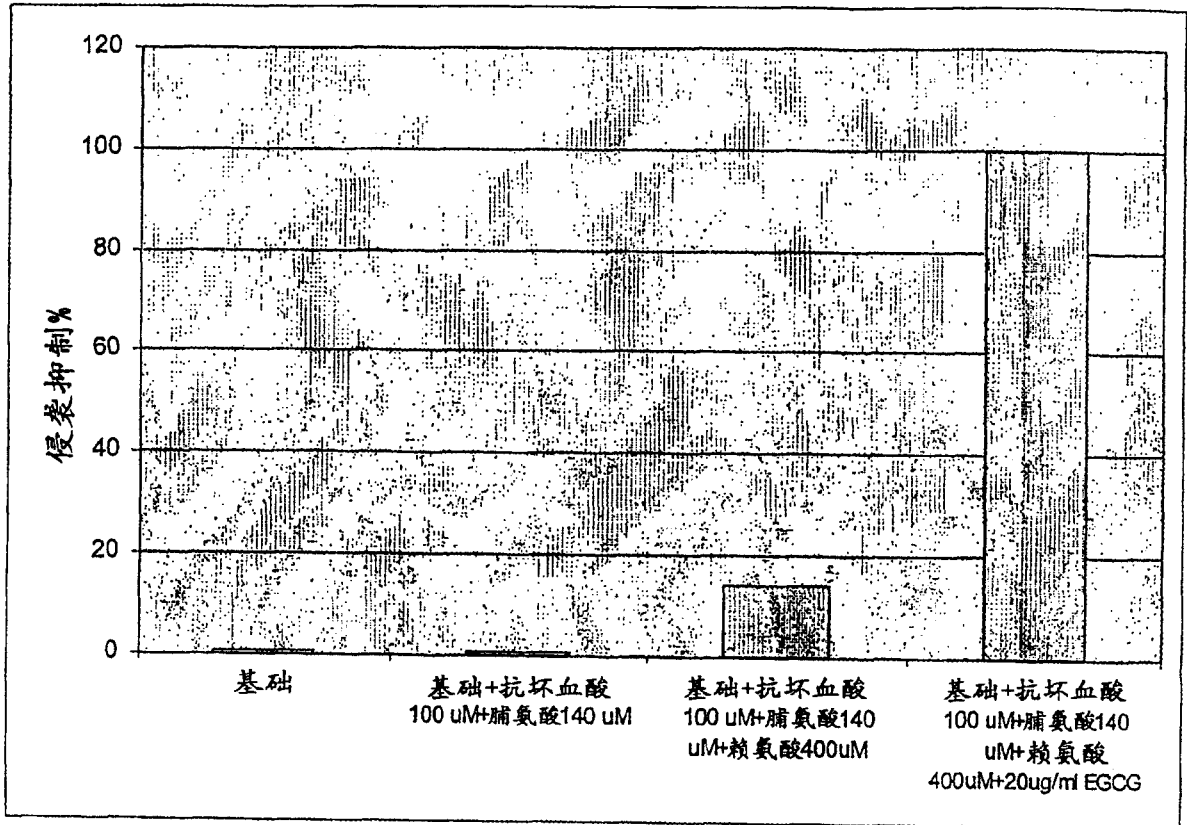


图 3

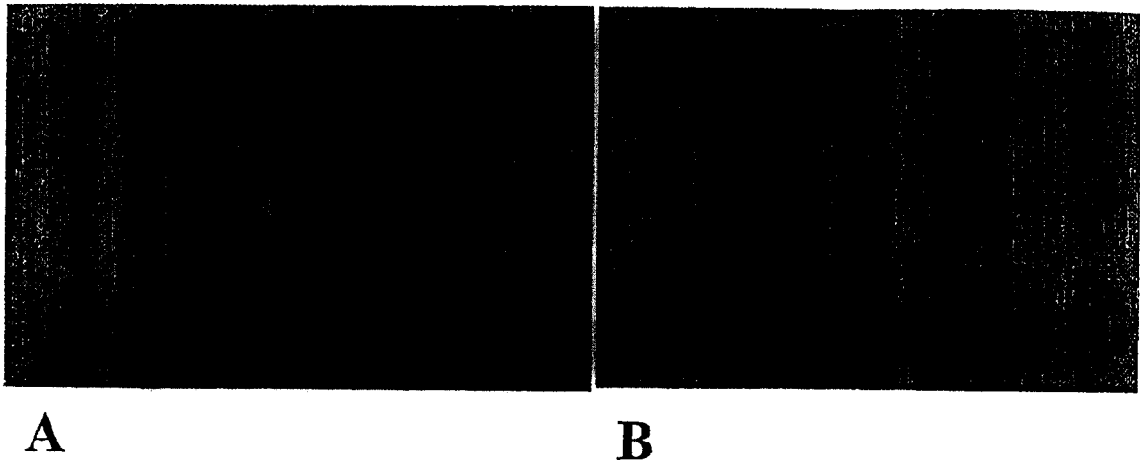


图4

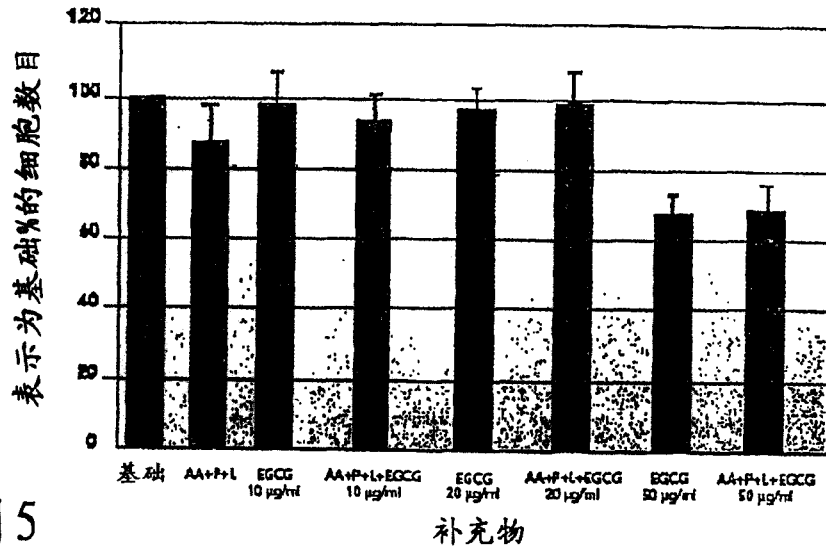


图 5

向基础中补充100 µM抗坏血酸(AA)、140 µM脯氨酸(P)、400 µM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对黑素瘤A2058细胞的细胞增殖的影响

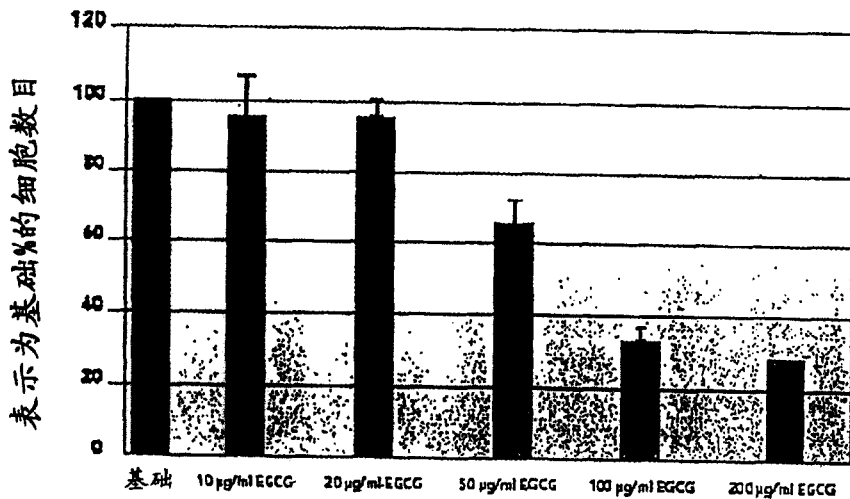


图 6

表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对乳腺癌细胞MDA-MB 231的细胞增殖的影响

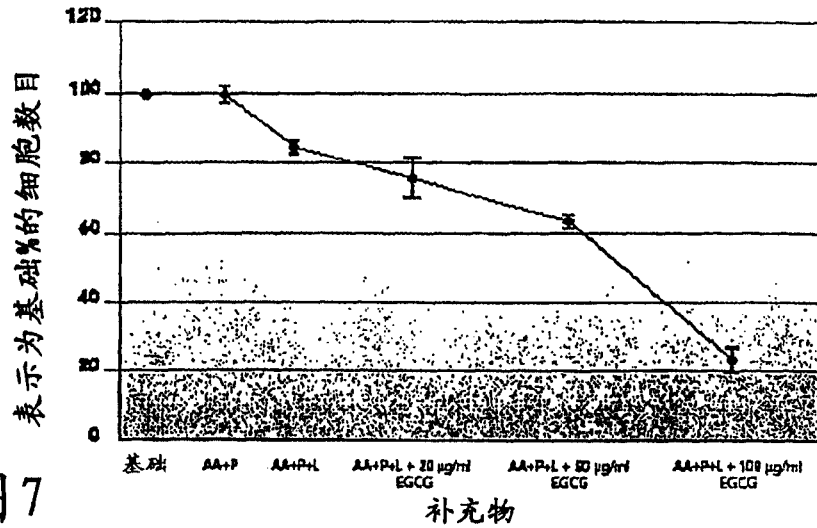


图 7

向基础中补充100 µM抗坏血酸(AA)、140 µM脯氨酸(P)、400 µM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对乳腺癌细胞MDA-MB231的细胞增殖的影响

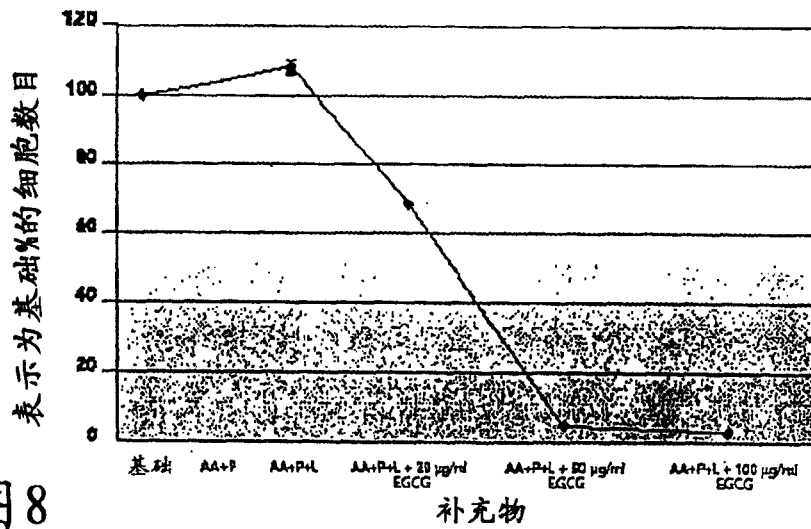


图 8

向基础中补充100 µM抗坏血酸(AA)、140 µM脯氨酸(P)、400 µM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对结肠癌细胞HCT116的细胞增殖的影响

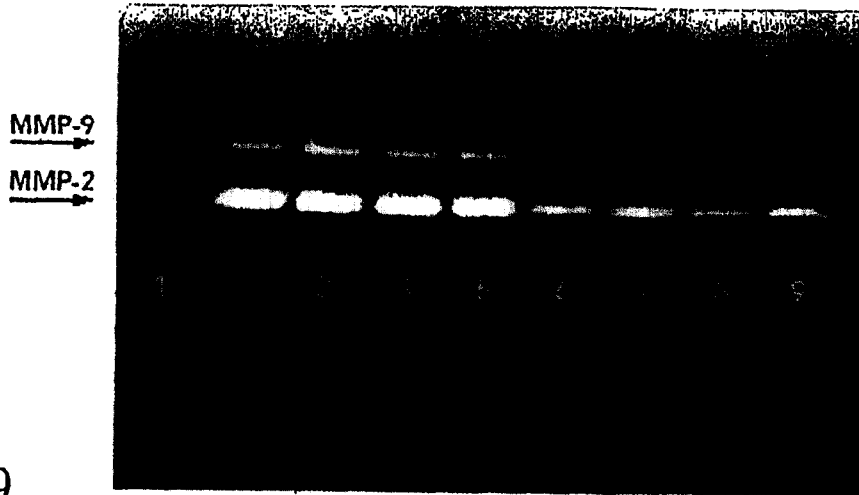


图9

补充物

向基础中补充100μM抗坏血酸(AA)、140μM脯氨酸(P)、400μM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对黑素瘤细胞表达基质金属蛋白酶(MMP)的影响

- 1. 标志; 2. 基础; 3. AA+P+L; 4. EGCG 10μg/ml; 5. AA+P+L+10μg/ml EGCG;
- 6. EGCG 20μg/ml; 7. AA+P+L+EGCG 20μg/ml; 8. EGCG 50μg/ml;
- 9. AA+P+L+EGCG 50μg/ml

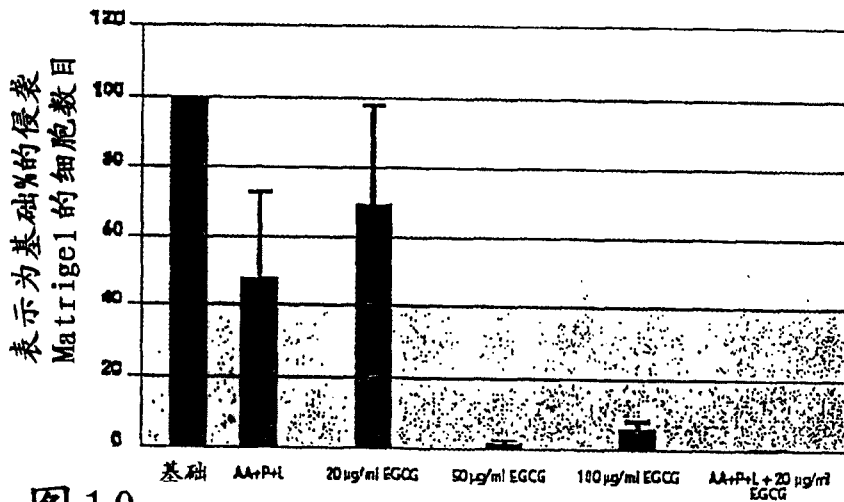


图10

补充物

向基础中补充100 μM抗坏血酸(AA)、140 μM脯氨酸(P)、400 μM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对乳腺癌细胞MDA-MB 231侵袭Matrigel的影响

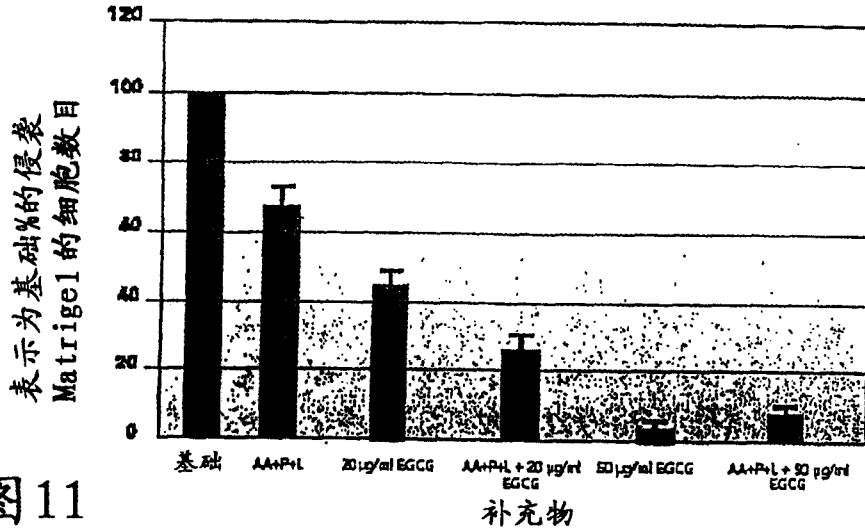


图 11

向基础中补充100 μM抗坏血酸(AA)、140 μM脯氨酸(P)、400 μM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对结肠癌细胞HCT116侵袭Matrigel的影响

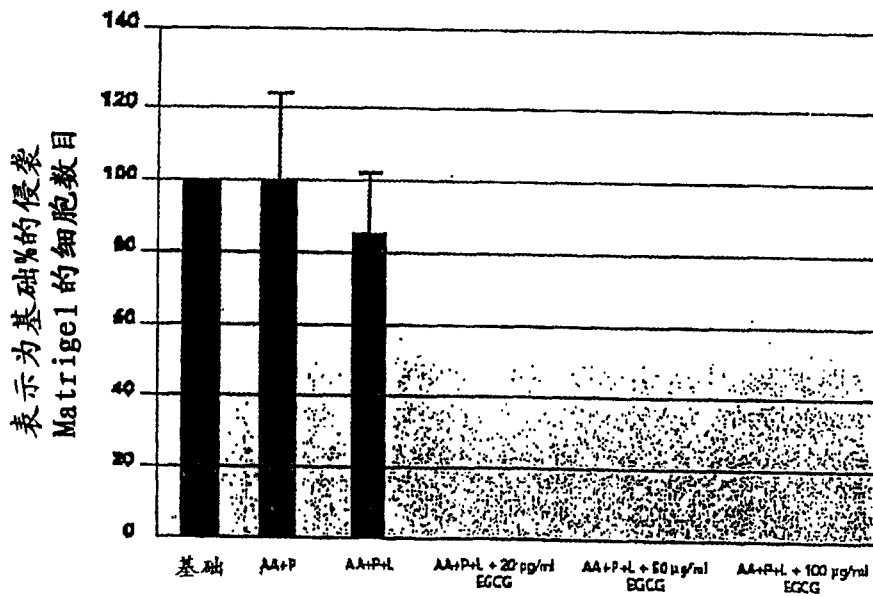
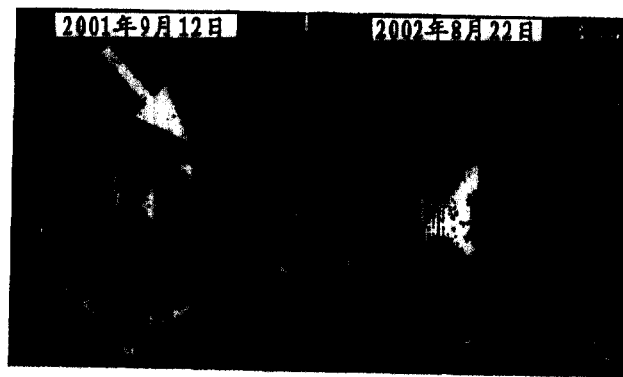


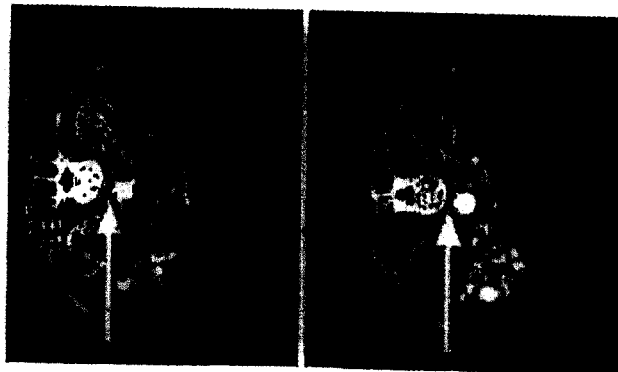
图 12

向基础中补充100 μM抗坏血酸(AA)、140 μM脯氨酸(P)、400 μM赖氨酸(L)和多种不同水平的表没食子儿茶精没食子酸盐(EGCG)对Matrigel的影响



描绘CT扫描

图 13



描绘CT扫描

图 14