

(19)



(10) **LT 5215 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5215**

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 31/353**
A61K 31/375
A61K 31/195
A61K 31/401
A61P 35/00

(21) Paraiškos numeris: **2004 074**

(22) Paraiškos padavimo data: **2004 08 05**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2004 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **2005 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP02/01005**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2002 01 31**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2004 08 05**

(30) Prioritetas: **10/041, 427, 2002 01 08, US**

(72) Išradėjas:

Matthias RATH, NL
Shrirang NETKE, CA
Vadim IVANOV, US
Waheed ROOMI, US
Aleksandra NIEDZWIECKI, US

(73) Patent savininkas:

Matthias RATH, Twentepoort Oost 3a, 7609 RG-Almeo, NL

(74) Patentinis patikėtinis:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B, Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Matricinės metalproteinazės inhibuojanti kompozicija neoplazinėms ligoms gydyti

(57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su biocheminių medžiagų kompozicija, apimančia katechino junginį, askorbo rūgštį, proliną ir liziną, kuri skirta neoplazinių susirgimų, susijusių su perdėta ekstraląstelinės matricos degeneracija, gydymui.

Šis išradimas yra susijęs su katechino junginių panaudojimu deriniuose su kitomis maisto sudėtinėmis dalimis matricinėms metalproteinazėms inhibuoti. Konkrečiau, šis išradimas yra susijęs su kompozicijų, į kurias įeina katechinas, askorbo rūgštis, lizinas ir prolinas, panaudojimu neoplazinėms ligoms gydyti.

Polifenolinių junginių, taip pat žinomų kaip katechinai, yra žaliojoje arbatoje, ir jie buvo pasiūlyti naudoti apsisaugojimui nuo įvairių ligų, įskaitant vėžį (Mukhtar H., Ahmed N. Am. J. Clin. Nutr. 71:1698S-1702S (2000)). Sadzuka ir kt. parodė, kad peroralinis žaliosios arbatos įvedimas sustiprina doksorubicino auglių inhibuojantį poveikį bandymuose su pelėmis.

Priešvėžinis katechinų aktyvumas gali būti susijęs su jų poveikiu į keletą faktorių, dalyvaujančių vėžinių ląstelių proliferacijoje ir jų metastazėje. Yra žinoma, kad katechinai sustabdo ląstelių ciklą žmogaus karcinomos ląstelių atveju (Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Munhtar H. J. Natl. Cancer Inst. 89: 1881-1886 (1997)). Parodyta, kad žaliosios arbatos polifenolinė frakcija apsaugo nuo uždegimo ir auglių sukeltų citokinų.

Žaliojoje arbatoje polifenoliniai junginiai sudaro 30 % sausos masės. Jie apima flavanolius, flavandiolius, flavonoidus ir fenolio rūgštis. Iš polifenolių žaliojoje arbatoje didžiausią kiekį sudaro flavanoliai, ir jie paprastai yra žinomi kaip katechinai. Žaliojoje arbatoje yra keturi pagrindiniai katechinai: 1) (-)-epikatechinas, 2) (-)-epikatechin-3-galatas, 3) (-)-epigalokatechinas ir 4) (-)-epigalokatechin-3-galatas (EGCG). Iš katechinų žaliojoje arbatoje pagrindinė polifenolinė sudedamoji dalis yra EGCG.

EGCG yra veiksmingas antioksidantinis junginys (J. Cell. Biochem. 265:236-257 (1996)) ir jam gali būti priskiriamas žaliosios arbatos priešvėžinis aktyvumas. Aprašyta, kad katechininiai junginiai turi antimetastazinį aktyvumą dėl to, kad jie sulaiko angiogenezės procesą (Cao Y., Cao R. Nature 398:381 (1999)). Taip pat buvo parodyta, kad EGCG trukdo pasireikšti urokinazės (u-plazminogeno aktyvatoriaus) – vieno iš dažniausiai ekspresuojamų fermentų

žmogaus vėžio atveju – aktyvumui (Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak J.E. *Nature* 387-567 (1997)).

Tačiau yra nustatyta, kad polifenolių bioprieinamumas žmonėms yra ypatingai mažas (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. *Amer. 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)). Čia pacituoti literatūros šaltiniai pridedami pilnos apimties. Maža koncentracija audiniuose labai sumažina polifenolių, įskaitant ir EGCD, terapinę vertę. Todėl yra pastovus poreikis surasti geresnę polifenolių turinčią kompoziciją, kuri būtų efektyvesnė neoplazinėms ligoms gydyti. Mes netikėtai radome kompoziciją, turinčią katechinų, askorbo rūgšties, prolino ir lizino, kuri gali padidinti stiprų antiproliferacinį ir antimetastazinį aktyvumą prieš neoplazines ligas.

Šis išradimas yra susijęs su biocheminių medžiagų kompozicija, turinčia katechino, antioksidanto, prolino ir lizino, kuri yra veiksminga žmonių ligoms gydyti.

Šis išradimas yra susijęs su biocheminių medžiagų kompozicija, turinčia katechino, antioksidanto, prolino ir lizino, kuri yra veiksminga matricinei metalproteinazei inhibuoti.

Šis išradimas yra susijęs su neoplazinių ligų, susijusių su perdėta ekstraląstelinės matricos degradacija, gydymo būdu, apimančiu kompozicijos, turinčios katechino, antioksidanto, prolino ir lizino, efektyvaus kiekio įvedimą.

FIG.1 pavaizduota EGCG inhibiciniai poveikiai į krūties vėžio ląstelių (MDA-MB 231) proliferaciją.

FIG.2 pavaizduota EGCG, askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinio sinergetiniai inhibiciniai poveikiai į krūties vėžio ląstelių (MDA-MB 231) proliferaciją.

FIG.3 pavaizduota EGCG, askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinio sinergetiniai inhibiciniai poveikiai į storosios žarnos vėžio ląstelių (HCT116) proliferaciją.

FIG.4 pavaizduota, kad EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$) maždaug 25 % inhibuoja krūties vėžio ląstelių įsiskverbimą į matrigelį. Askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinys inhibuoja maždaug 65 %. Askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinys su EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$) pilnai inhibuoja (apie 100 %) įsiskverbimą į matrigelį.

FIG.5 pavaizduota, kad askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinys su EGCD (20 $\mu\text{g/ml}$) sinergetiškai inhibuoja iki 100 % melanomos ląstelių (A2058) įsiskverbimą į matrigelį.

FIG.6 pavaizduota zimograma, rodanti, kad EGCG mažina krūties vėžio ląstelių išskirtos MMP2 aktyvumą.

FIG.7 pavaizduota normali melanomos ląstelių morfologija po matrigelio įsiterpimo testo.

FIG.8 pavaizduoti pokyčiai, kuriuos sukėlė askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinys melanomos ląstelių morfologijoje.

FIG.9 pavaizduoti askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinio su EGCG apoptoziniai poveikiai.

Kitame įgyvendinimo variante šis išradimas yra susijęs su kompozicija, turinčia arbatos ekstraktuose esančių katechinų, raudonojo vyno derinyje su kitomis maisto sudėtinėmis dalimis dėl sinergetinio poveikio, nuo neoplazinių ligų ir įvairių kitų ligų. Maisto sudėtinės dalys, kurias apima ši paraiška, yra, bet jomis neapsiribojama, šioje paraiškoje detalizuotos sudėtinės dalys.

Katechininiai junginiai gali būti naudojami derinyje su kitais antioksidantais, tokiais kaip vitaminas E, glutationas, su kitais flavinoidais, pagalbiniais agentais, kaip folio rūgštis, ir su metalais, tokiais kaip selenas, kuris, kaip žinoma, tinkamai modifikuoja matricinių metalproteinazių aktyvumą, kas leis mums sumažinti veiksmingą koncentraciją, kurioje gali pasireikšti EGCG priešnavikinis aktyvumas.

Kitame įgyvendinimo variante šis išradimas yra susijęs su katechinų turinčia kompozicija, kuri veiksmingai sumažina normalių kūno ląstelių transformaciją į vėžines ląsteles.

Kitame įgyvendinimo variante šis išradimas yra susijęs su katechinų turinčia kompozicija, kuri yra veiksminga norint apsisaugoti nuo vėžinių

ląstelių proliferacijos ir sumažina įvairių matricinių metalproteinazių, kurios skaldo ekstraląstelinę matricą (ECM), sintezę, sekreciją ir/arba aktyvumą.

Kitame įgyvendinimo variante šis išradimas yra susijęs su neoplazinių būklių profilaktikos ir gydymo būdu, skiriant vartoti tokią kompoziciją, kurioje yra katechinų, askorbo rūgšties, prolino ir lizino, peroraliniu arba vietiniu būdu.

Šis išradimas yra aprašytas smulkiau remiantis toliau duodamais pavyzdžiais, kurie neapriboja išradimo.

Bendros eksperimentų sąlygos

(a) Ląstelių linijos

Tyrimuose buvo naudotos šios iš ATCC gautos vėžinių ląstelių linijos:

- (i) krūties vėžio ląstelės MDA-MB 231,
- (ii) žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelės HCT 116,
- (iii) žmogaus melanomos ląstelės A 2058.

(b) Ląstelių proliferacijos tyrimai

Katechinų ir maisto sudėtinių dalių poveikiui į žmogaus vėžinių ląstelių proliferaciją tirti įvairios žmogaus vėžinės ląstelės buvo auginamos 24 duobučių plokštelėse naudojant ATCC (ląstelių linijų tiekėjo) tiksliai apibrėžtas sąlygas. Paprastai ląstelės buvo inkubuojamos 3-4 dienas (iki koalescencijos). Bendras ląstelių skaičius auginimo duobutėje buvo nustatomas nudažant ląsteles gyvybingais dažais (MTT), o po to nustatant dažymo tirpalo OD. MTT nudažo tik negyvas ląsteles ir sunaudotų dažų kiekis koreliuojasi su negyvų ląstelių skaičiumi kultūroje. Inhibavimo procentas buvo apskaičiuotas lyginant bandomųjų grupių OD su kontrolinių grupių OD.

(c) Įsiterpimo į matrigelį tyrimai

Įsiterpimo į matrigelį tyrimai buvo atlikti naudojant Matrigel (Beckton Dickinson) įdėklus tam tikslui pritaikytose 24 duobučių plokštelėse. Šis testas yra patikimas testas vėžio metastazėms įvertinti.

Buvo pasėtos žmogaus fibroblastų ląstelės ir auginamos 24 duobučių plokštelėse naudojant auginimo terpę, turinčią ~10 % serumo. Kai fibroblastai

pasiekė koalescenciją, auginimo terpė su serumu buvo pašalinta ir pakeista šviežia terpe be serumo. Į terpę be serumo pridėta katechino junginių derinio plius maistinės kompozicijos ir ant matrigelio įdėklų viršutinio paviršiaus pasėtos žmogaus vėžinės ląstelės.

Po 18 valandų terpė buvo pašalinta. Šiek tiek terpės buvo pasilieama zimogramų tyrimams. Ląstelės nuo viršutinio įdėklų paviršiaus buvo atsargiai nubraukiamos su medvilniniu tamponu. Ląstelės, kurios įsiskverbė į matrigelio membraną ir nukeliavo į apatinį matrigelio paviršių buvo nuspalvintos Quick Stain dažais ir suskaičiuotos po mikroskopu.

(d) Zimogramų tyrimai

Terpė (25-30 μ l) iš įsiskverbimo į matrigelį tyrimų buvo užpilta ant Novex zimogramų gelių (Invitrogen). Gelio plokštelės buvo išryškintos ir nudažytos pagal gamintojo rekomendacijas. Matricinių metalproteinazių (MMP'ų) juostelės buvo identifikuotos remiantis jų žinomomis molekulinėmis masėmis.

(e) Morfologiniai tyrimai

Žmogaus vėžinių ląstelių, kurios nukeliavo į apatinį matrigelio membranos paviršių, morfologijai tirti ląstelės buvo nudažytos Quick Stain dažais ir nufotografuotos po mikroskopu (100X).

1 pavyzdys

Epigalokatechingalato (EGCG) inhibicinis poveikis į krūties vėžio ląstelių (MDA MB 231) proliferaciją

Šiuose tyrimuose į kiekvieną 24 duobučių plokštelės duobutę buvo pasėta po 5×10^4 krūties vėžio ląstelių (MDA MB 231). Kontrolinę grupę sudarė krūties vėžio ląstelės, kurios buvo auginamos Liebovitz'o terpėje su 10 % fetalinio jaučio serumo (FBS). Tiriamąją grupę sudarė krūties vėžio ląstelės, kurios buvo augintos Liebovitz'o terpėje su 10 % fetalinio jaučio serumo (FBS) plius 0, 10, 20, 50, 100 arba 200 mg/ml EGCG. Plokštelės buvo inkubuojamos kambario atmosferoje (be papildymo CO_2) 4 dienas.

Šio laikotarpio pabaigoje auginimo terpė buvo pašalinta ir kiekvienoje duobutėje esančios ląstelės nudažytos MTT. MTT dažų perteklius buvo nuplautas. MTT nudažytos vėžinės ląstelės buvo ištirpintos 1 ml DMSO tirpalo. Nustatytas kiekvienos duobutės tirpalo optinis tankis (OD). Duobutės tirpalo OD yra tiesiogiai proporcingas negyvų ląstelių skaičiui. MTT nudažytų vėžinių ląstelių, kurios buvo auginamos nesant EGCG, OD buvo naudojamas kaip etalonas ir priimtas už 100. Inhibicijos procentai buvo skaičiuojami pagal formulę:

$$\text{Inhibicijos \%} = (\text{etaloninis OD} - \text{testo OD}) / \text{etaloninis OD} \times 100\%.$$

EGCG, esant 20, 50, 100 ir 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijoms, sukėlė atitinkamai 3, 34, 66 ir 70 % žmogaus vėžinių ląstelių proliferacijos inhibiciją (FIG.1). 10 $\mu\text{g/ml}$ EGCG koncentracija ląstelių proliferacijos neinhibavo.

2 pavyzdys

Askorbo rūgštis, prolino ir lizino derinio su įvairiomis EGCG koncentracijomis inhibicinis poveikis į krūties vėžio ląstelių (MDA MB 231) proliferaciją

Bendroji šių tyrimų metodika išlieka ta pati kaip ir 1 pavyzdyje.

Šiuose tyrimuose pagrindinė auginimo terpė buvo papildyta tokiais priedais:

- (i) askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM);
- (ii) askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM) + lizinas (400 μM);
- (iii) askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM) + lizinas (400 μM) + 20 mg/ml EGCG;
- (iv) askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM) + lizinas (400 μM) + 50 mg/ml EGCG arba
- (v) askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM) + lizinas (400 μM) + 100 mg/ml EGCG.

Askorbo rūgštis + prolinas nedavė ląstelių proliferacijos inhibicijos. Askorbo rūgštis + prolinas + lizinas inhibavo ląstelių proliferaciją maždaug 14 % (FIG.2). Askorbo rūgštis + prolino + lizino derinys plius 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG sukėlė 20 % inhibiciją (FIG.2). 20 $\mu\text{g/ml}$ vien tik EGCG sukėlė tik 3 % inhibiciją

(1 pavyzdys). Taigi, askorbo rūgštis, prolino ir lizino derinys su EGCG veikia sinergetiškai inhibuodamas vėžinių ląstelių proliferaciją.

3 pavyzdys

Askorbo rūgštis, prolino ir lizino derinio su įvairiais EGCG kiekiais inhibicinis poveikis į žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių (HCT 116) proliferaciją

Šiame tyrime žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelės buvo auginamos McCoy 5A terpėje su 10 % fetalinio jaučio serumo 5 % CO₂ atmosferoje. Bendroji metodika ir vaisto poveikio tyrimai buvo tokie patys kaip ir 2 pavyzdyje.

Askorbo rūgštis + prolino + lizino derinys su EGCG sinergetiškai didino ląstelių proliferacijos inhibicijos efektus nuo 0 % iki 31 % esant 20 µg/ml EGCG ir apie 95 % esant 50 µg/ml EGCG (FIG.3).

EGCG IR ASKORBO RŪGŠTIS, PROLINO IR LIZINO DERINIO INHIBICINIS POVEIKIS Į VĖŽINIŲ LĄSTELIŲ ĮSISKVERBIMĄ Į MATRIGELĮ

4 pavyzdys

Laipsniškų EGCG kiekių ir askorbo rūgštis, prolino ir lizino derinio su įvairiais EGCG kiekiais inhibicinis poveikis į krūties vėžio ląstelių (MDA MB 231) skverbimąsi per matrigelį

Bendroji įsiterpimo į matrigelį testo metodika buvo aprašyta aukščiau. Šiame teste krūties vėžio ląstelės (5x10⁴) buvo pasėtos ant kiekvieno įdėklo. Į Leibovitz'o terpę pridėta įvairių priedų. Plokštelės buvo inkubuojamos kambario atmosferoje nepapildant CO₂.

Kompozicija, turinti terpėje 20 arba 50 µg/ml EGCG, inhibavo krūties vėžio ląstelių įsiskverbimą atitinkamai maždaug 26 ir 100 %. Askorbo rūgštis (100 µM) + prolino (140 µM) + lizinas (400 µM) šioje terpėje sukėlė 65 % inhibiciją, tuo tarpu kai askorbo rūgštis (100 µM) + prolino (140 µM) + lizino (400 µM) plius 20 µg/ml EGCG kompozicija pilnai (100 % inhibicija) inhibavo vėžinių ląstelių įsiskverbimą (FIG.4).

5 pavyzdys

Laipsniškų EGCG kiekių ir askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinio su įvairiais EGCG kiekiais inhibicinis poveikis į žmogaus melanomos ląstelių (A2358) skverbimąsi per matrigelį

Bendroji įsiterpimo į matrigelį testo metodika buvo aprašyta aukščiau. Žmogaus melanomos ląstelės (A2058) (5×10^4) buvo pasėtos ant kiekvieno įdėklo. Į DMEM pridėta įvairių priedų. Plokštelės buvo inkubuojamos inkubatoriuje 5 % CO₂ atmosferoje.

Askorbo rūgštis (100 μM) + prolinas (140 μM) + lizinas (400 μM) sukėlė tik 13 % inhibiciją, tuo tarpu kai askorbo rūgšties (100 μM) + prolino (140 μM) + lizino (400 μM) plius 20 μg/ml EGCG derinys pilnai apsaugojo nuo melanomos ląstelių skverbimosi per matrigelį (FIG.5).

ZIMOGRAMŲ TYRIMAI

6 pavyzdys

Laipsniškų EGCG kiekių poveikis į krūties vėžio ląstelių (MDA MB 231) sukeltą MMP2 gaminimąsi

Terpė iš įvairių įsiskverbimo į matrigelį tyrimų (4 pavyzdys) buvo užpilta ant Novex zimogramų gelių (Invitrogen). Plokštelės buvo išryškintos ir nudažytos pagal gamintojo rekomendacijas. Matricinių metalproteinazių (MMP'ų) juostelės buvo identifikuotos remiantis jų žinomomis molekulinėmis masėmis (FIG.6).

Augimo terpės iš įsiskverbimo į matrigelį testo zimogramos parodė, kad, esantis terpėje 20 μg/ml EGCG, sumažina MMP2 gaminimąsi ir pilnai inhibuoja MMP9 gaminimąsi (FIG.6). Esant 50 μg/ml ir 100 μg/ml EGCG koncentracijoms, MMP2 ir MMP9 aktyvumai buvo pilnai inhibuoti (FIG.6).

LĄSTELIŲ MORFOLOGIJA

7 pavyzdys

EGCG ir askorbo rūgšties, prolino ir lizino derinio poveikis į žmogaus melanomos ląstelių (A2058) morfologiją

Vėžinių ląstelių, esančių pagrindinėje terpėje, kai jos keliavo per matrigelį, mikrofotografijos yra parodytos FIG.7. Pridėjus į terpę askorbo rūgšties (100 μm) + prolino (140 μm) + lizino (400 μm) derinio, ląstelių morfologija pasikeitė (FIG.8). Aiškiai matomas ląstelių išsitempimas su aiškiu branduolių padidėjimu. Terpėje pridėjus į askorbo rūgšties (100 μm) + prolino (140 μm) + lizino (400 μm) derinį 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG, sukeliami smarkūs apoptoziniai pokyčiai (FIG.9).

Šie 1-7 pavyzdžiuose aprašyti duomenys parodo, kad EGCG turi stiprų sinergetinį efektą, kai EGCG yra naudojamas su askorbo rūgšties + prolino + lizino deriniu. Tokiu būdu šie tyrimai rodo, kad stebėtinai EGCG ir askorbo rūgšties + prolino + lizino derinio sinergetinis efektas duoda galimybę pilnai išnaudoti EGCG antiproliferacinį ir antimetastazinį aktyvumą esant palyginus mažoms jo koncentracijoms audiniuose.

Taigi, šie duomenys yra milžiniškos svarbos, kadangi galima patiekti efektyvius katechinų kiekius, artimesnius tiems, kurie gali būti pasiekiami audiniuose.

Buvo teigiama, kad vėžinių ląstelių proliferaciją ir jų fermentų pozityviąją reguliaciją sukelia padidinta reaktinių deguonies dalelių (ROS) koncentracija. Šioje situacijoje įvairių biologinių antioksidantų, tokių kaip tokoferoliai, karotinoidai, derinio naudojimas kartu su kitais palengvinančiais agentais, tokiais kaip ubichinoliai, bioflavonoidai, lipo rūgštis, karnitinas, duos veiksmingesnį sinergetinį mišinį aukščiau minėtoms ligoms gydyti.

Šiame išradime yra pateikiamas nelauktas pastebėjimas, kad katechininių junginių turintis derinys gali rodyti sinergetinį aktyvumą ir tokiu būdu duoti galimybę pasiekti labai veiksmingą priešvėžinį aktyvumą esant mažesniems katechinų kiekiams audiniuose. Aukščiau aprašyti duomenys atveria galimybę naudoti įvairias sudėtines dalis derinyje su įvairiomis

sudedamomis dalimis, imant jų veiksmingus kiekius, neoplazinių ligų prevencijai ir gydymui.

Specialistas supras, kad prolinas ir lizinas nėra apriboti tik prolinu ir lizinu. Pagal šį išradimą yra laikoma, kad jis apima lizino darinius ir jo pirmtakus, prolino darinius ir jo pirmtakus.

Specialistas supras, kad antioksidantas (askorbo rūgštis) turėtų apimti ir askorbo rūgšties darinius bei jos pirmtakus.

Kiti biologiniai antioksidantai apima tokoferolius ir giminingus junginius, trans-retinoinę rūgštį ir giminingus junginius, karotinoidus ir giminingus junginius, glutationą ir giminingus junginius, ubichinolius ir giminingus junginius, folatus ir giminingus junginius, bioflavonoidus ir giminingus junginius, bei seleno junginius.

Klinikinis panaudojimas

Šis išradimas sutelktas katechino, esančio derinyje su antioksidantu, prolinu ir lizinu, prevenciniam ir terapiniam panaudojimui. Bendras katechino naudojimas su antioksidantu, prolinu ir lizinu padidina katechininio junginio veiksmingumą gydant žmonių ligas.

Žmonių ligos apima, bet jomis neapsiriboja, neoplazines ligas, uždegimines būkles, širdies ir kraujagyslių ligas ir kitas patologines būkles, kurios susiję su ekstraląstelinės matricos degradacija. Tokios būklės apima anomalią angiogenezę, pataloginį medžiagos patekimą į kraujagyslės vidų, reumatinį ir osteoartritą, aterosklerozę, širdies raumens išsiplėtimą, emfizemą ir kitas chroniškas būkles.

Šiame išradime yra pateikiamas žmogaus ligų, įskaitant ekstraląstelinės matricos degradaciją, tokių kaip i) neoplazinės ligos; ii) uždegiminės būklės (įskaitant, bet neapsiribojant, alergijas, emfizemą, reumatinį artritą, osteoartritą, periodontitą, neurodermatitą); iii) infekcinės ligos (įskaitant, bet neapsiribojant, virusines infekcijas, tokias kaip paprastas peršalimas, gripas, hepatitas, herpesas, ŽIV; bakterines infekcijas, tokias kaip pneumonija, tuberkuliozė, meningitas, gonorėja, sifilis ir/arba grybelinės ligos); iv) širdies ir kraujagyslių ligos (įskaitant, bet neapsiribojant, aterosklerozę, kardiomiopatiją, restonozę po angioplazijos); v) degeneracinės ligos (įskaitant,

bet neapsiribojant, osteoporozę ir artrita); vi) neurologiniai sutrikimai (įskaitant, bet neapsiribojant, Alchaimerio ligą, išsėtinę sklerozę); ir vii) autoimuninės ligos (įskaitant, bet neapsiribojant, artrita), gydymo ir prevencijos būdas, skiriant efektyvų kiekį šioje paraiškoje aprašytos kompozicijos.

Išradimo apibrėžtis

1. Biocheminių medžiagų kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima katechininį junginį, antioksidantą, proliną ir liziną, kuri veiksmingai inhibuoja matricinę metalproteinazę.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad matricinė metalproteinazė yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš matricinės metalproteinazės 1, matricinės metalproteinazės 2, matricinės metalproteinazės 3, matricinės metalproteinazės 4, matricinės metalproteinazės 5, matricinės metalproteinazės 6, matricinės metalproteinazės 7, matricinės metalproteinazės 8, matricinės metalproteinazės 9, matricinės metalproteinazės 10, matricinės metalproteinazės 11, matricinės metalproteinazės 12 ir matricinės metalproteinazės 14.
3. Kompozicijos pagal 1 punktą panaudojimas gamybai farmacinės kompozicijos, skirtos žmogaus ligų, susijusių su padidintu matricinės metalproteinazės aktyvumu, gydymui.
4. Panaudojimas pagal 3 punktą, kuriame žmogaus liga yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš neoplazinių ligų, uždegiminių ligų, infekcinių ligų, širdies ir kraujagyslių ligų, degeneracinių ligų, neurologinių ligų ir autoimuninių ligų.
5. Kompozicijos pagal 1 punktą panaudojimas gamybai farmacinės kompozicijos, skirtos neoplazinių ligų, susijusių su perdėta ekstraląstelinės matricos degeneracija, gydymui.
6. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad katechininis junginys yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš epikatechinų, epigalokatechino, epikatechingalato ir epigalokatechingalato.
7. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antioksidantas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš askorbo rūgšties, tokoferolių, tokotrienolių, karotinoidų, gliutatioono, alfa-lipo rūgšties, ubichinolių, bioflavonoidų ir karnitino.

8. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antioksidantas yra askorbo rūgštis.
9. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad askorbo rūgštis dar apima askorbato pirmtakus askorbato metabolitus ir askorbato druską.
10. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antioksidantas apima dar ir folio rūgštį.
11. Kompozicija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad folio rūgštis yra foliatas.
12. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir selenas.
13. Kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad selenas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš selinito ir metilselinato.
14. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima *biocheminių medžiagų* kompoziciją pagal 1 punktą.
15. Farmacinė kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta farmacinė kompozicija panaudojama peroraliniam vartojimui, parenteriniam vartojimui arba vietiniam vartojimui.

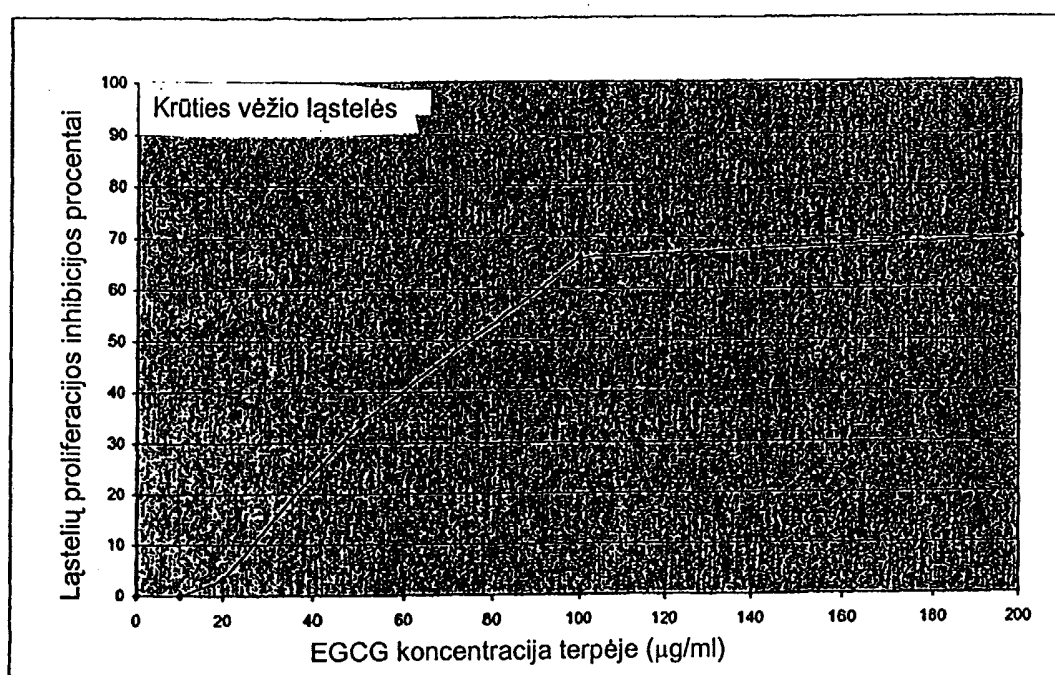


Fig.1: Įvairių epigalokatechingalato (EGCG) koncentracijų inhibicinis poveikis į krūties vėžio ląstelių proliferaciją

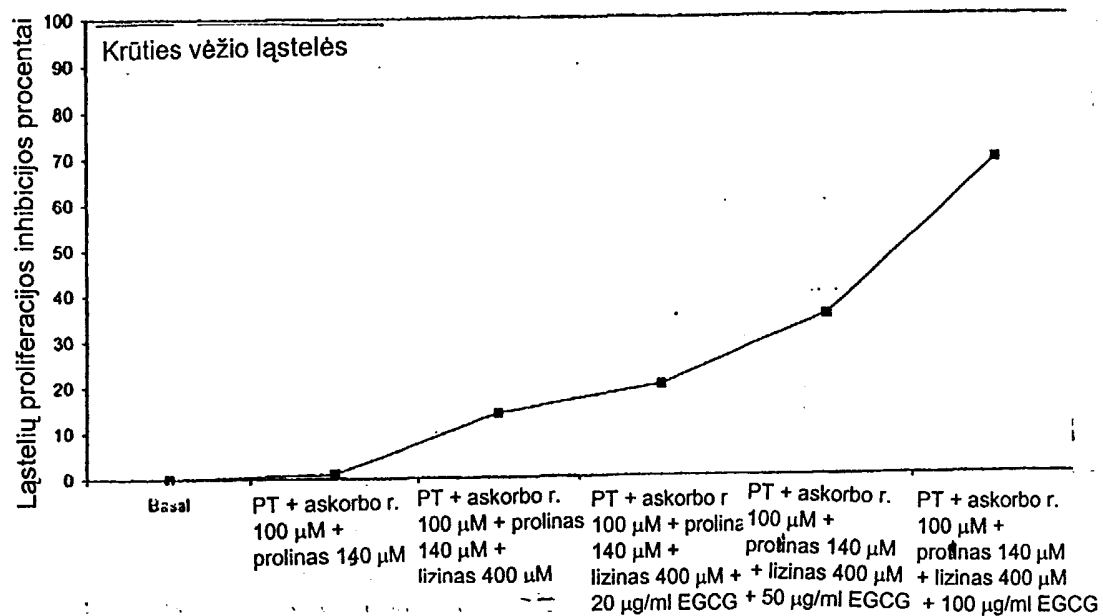


Fig.2: Askorbo rūgšties + prolino, askorbo rūgšties + prolino + lizino, askorbo rūgšties + prolino + lizino + įvairių epigalokatechingalato (EGCG) koncentracijų įtaka į krūties vėžio ląstelių proliferaciją

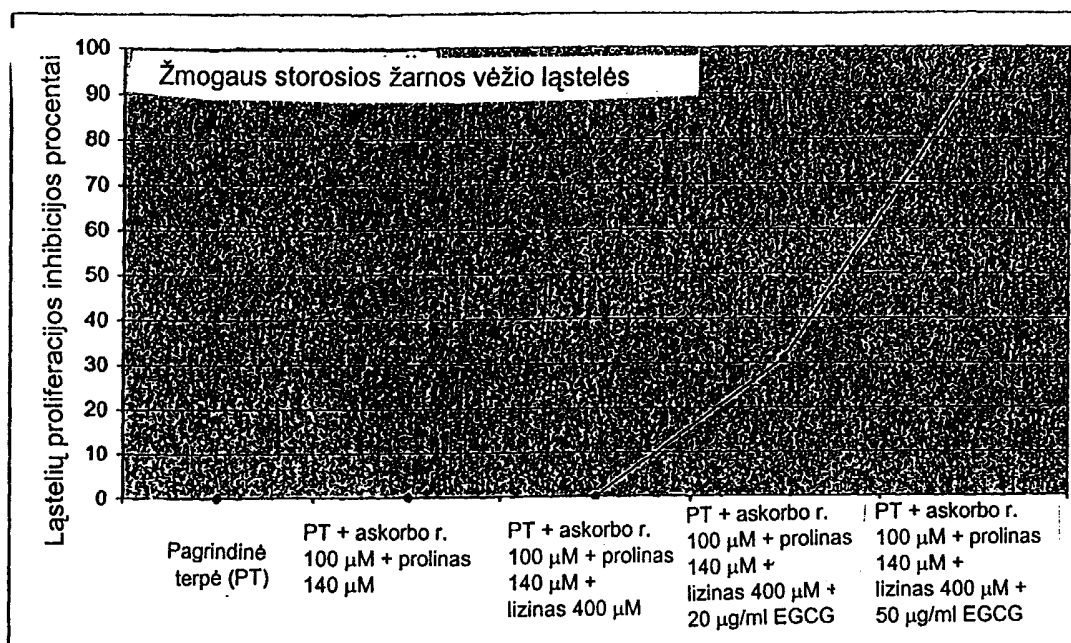


Fig.3: Askorbo rūgšties + prolino, askorbo rūgšties + prolino + lizino, askorbo rūgšties + prolino + lizino + įvairių epigalokatechingalato (EGCG) koncentracijų įtaka į žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių proliferaciją

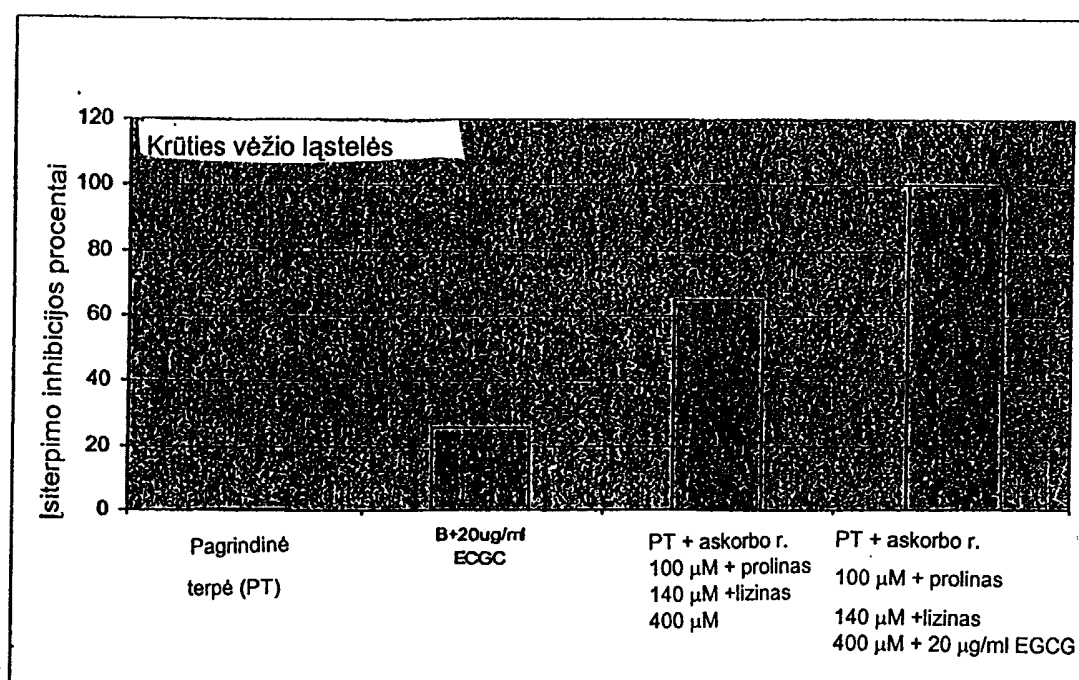


Fig.4: Askorbo rūgšties + prolino + lizino ir epigalokatechingalato (EGCG) sinergetinis inhibicinis poveikis į krūties vėžio ląstelių įsiterpimą į matrigelį

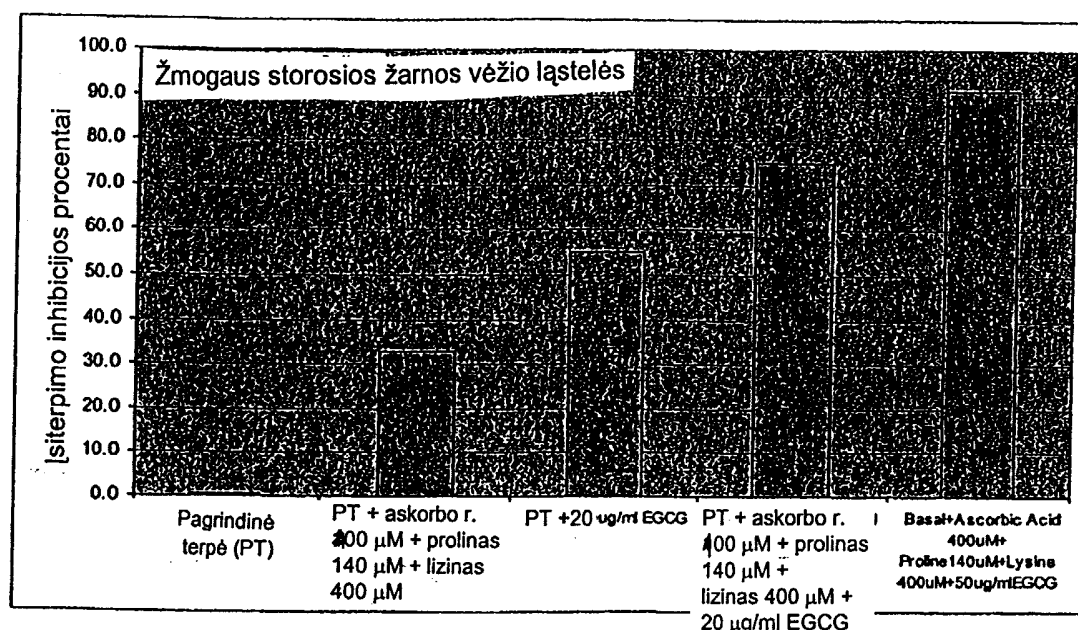


Fig.5: Askorbo rūgšties + prolino + lizino ir epigalokatechingalato (EGCG) sinergetinis inhibicinis poveikis į žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių išterpimą [matrigel]

Juostos 1 2 3 4 5 6

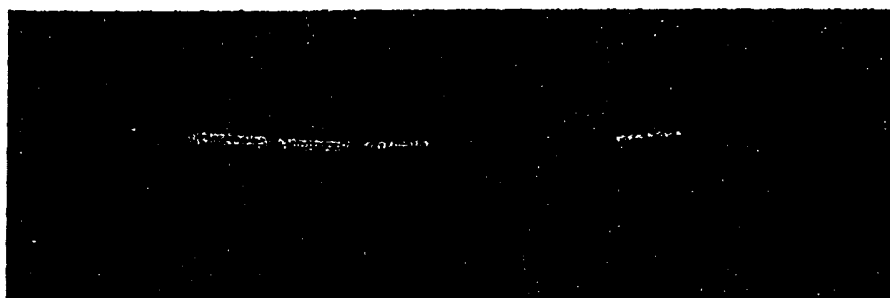


Fig.6: Askorbo rūgštis 100 μ M + prolinas 140 μ M + lizinas 400 μ M ir įvairių epigalokatechingalato (EGCG) koncentracijų įtaka į MMP2 gaminimąsi veikiant krūties vėžio ląstelėms

1 takelis - pagrindinė terpė; 2 takelis - pagrindinė terpė + askorbo rūgštis 100 μ M + prolinas 140 μ M + lizinas 400 μ M; 3 takelis - pagrindinė terpė + askorbo rūgštis 100 μ M + prolinas 140 μ M + lizinas 400 μ M + EGCG 20 μ g/ml; 4 takelis - pagrindinė terpė + askorbo rūgštis 100 μ M + prolinas 140 μ M + lizinas 400 μ M + EGCG 50 μ g/ml; 5 takelis - pagrindinė terpė + askorbo rūgštis 100 μ M + prolinas 140 μ M + lizinas 400 μ M + EGCG 100 μ g/ml; 6 takelis - pagrindinė terpė + EGCG 20 μ g/ml.



Fig.7: Normalios melanomos ląstelės

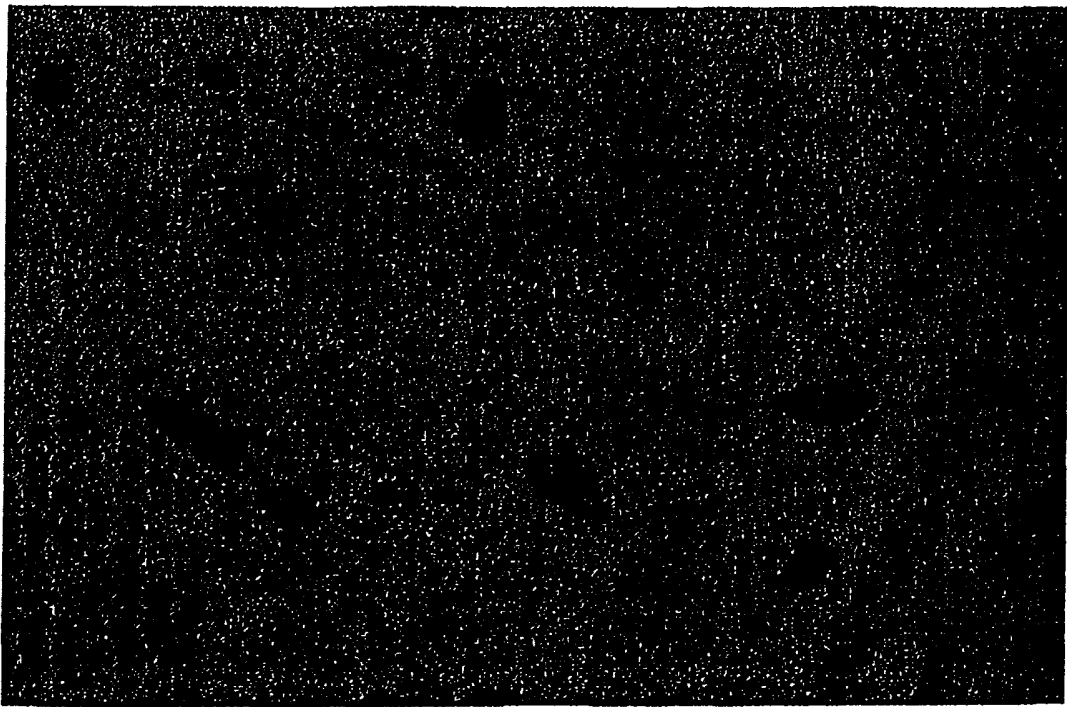


Fig.8: Askorbo rūgšties 100 μ M, prolino 140 μ M ir lizino 400 μ M apoptozinis poveikis į melanomos ląsteles. Ląstelės yra išstetos, o branduoliai ryškiau nudažyti.

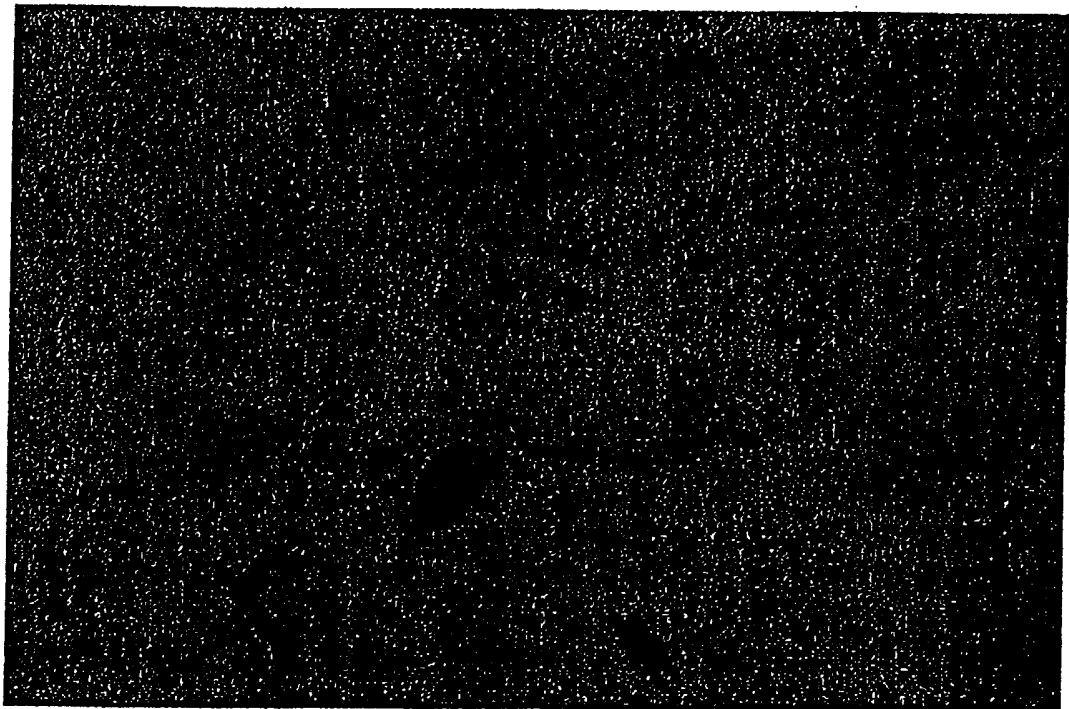


Fig.9: Askorbo rūgštis 100 μ M, prolino 140 μ M, lizino 400 μ M ir 20 μ g/ml EGCG apoptozinis poveikis į melanomos ląsteles. Ląstelės yra suardytos.