

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER QUE COMPRENDE SAL METÁLICA DE LACTATO

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para tratar el cáncer incluyendo las sales de lactato metálico y más particularmente a una composición farmacéutica para tratar el cáncer incluyendo, como ingredientes activos, sales de lactato metálicas capaces de disociar el lactato, lo cual puede perturbar el metabolismo de las células cancerosas y de esta forma inhiben eficazmente actividades tales como crecimiento, invasión y metástasis de las células cancerosas, dentro de las células cancerosas, una composición farmacéutica para inhibir metástasis cancerígenas y una composición alimenticia para mejorar el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Según los datos publicados en 2011, un total de 218,017 casos de cáncer se informó que se han producido en Corea del Sur en 2011. Las tasas brutas de incidencia fueron 439.2 para los varones y 431.0 para las mujeres por 100,000 personas. El orden de incidencia del cáncer fue el estómago, colorrectal, pulmón, hígado y cáncer de mama. Los 5 principales tipos de cáncer descritos anteriormente tienen más del 50% de tasa de incidencia de todos los cánceres. Los cánceres más comunes para el varón fueron cáncer de estómago, colorrectal, de pulmón y de hígado en secuencia, y para mujeres fueron cáncer de mama, colorrectal, estómago y pulmón excepto cáncer de tiroides. Si las personas de Corea del Sur viven a la esperanza de vida promedio, la probabilidad de contraer cáncer será del 36.9%. Se supone que 2 de cada 5 varones (38.1%) y 1 de 3 mujeres (33.8%) tienen probabilidades de desarrollar cáncer. La tasa estandarizada por edad (TAS) en Corea del Sur ajustada por la población mundial estándar fue de 295.1 por 100,000 habitantes, cifra inferior a la de los Estados Unidos (318.0) o Australia (323.0), pero superior al promedio de la OCDE (271.5). Según los datos de la Oficina Nacional de Estadística, el número de muertes causadas por cáncer fue de 75,334 personas en Corea del Sur en 2013, lo que representa el 28.3% del total de muertes, y se espera que la tasa de mortalidad por cáncer aumentará un 8.8% en 2 a 3 años. Por lo tanto, con el fin de tratar el cáncer con una alta incidencia y tasa de mortalidad, varios métodos de tratamiento se están intentando en todo el mundo. Hasta el momento, la cirugía y la terapia con fármacos contra el cáncer o la radioterapia son

las mejores opciones para tratar el cáncer de etapa temprana y avanzada de forma agresiva.

Para el tratamiento quirúrgico del cáncer, la clase y el tipo de tumor deben identificarse mediante el diagnóstico de tumor. En la mayoría de los casos, se realiza una biopsia para el diagnóstico. La cirugía es el tratamiento radical que todos los ganglios linfáticos que rodean el tumor y las lesiones primarias se eliminan, utilizando la exéresis radical. La exéresis radical se realiza preferentemente con el objetivo de recuperación completa. La tasa de mortalidad por exéresis se ha reducido a 1 a 3%, y la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes ha aumentado en más del 50%. Sin embargo, es bien sabido que los pacientes que se sometieron a cirugía tienen un riesgo de recaída. Además, la cirugía puede tener efectos secundarios agudos tales como sangrado, obstrucción intestinal, lesión vascular, lesión ureteral, rotura rectal, neumonía y embolia pulmonar causada por complicaciones y, por lo tanto, puede ser necesaria una reoperación. La quimioterapia es el tratamiento de enfermedades que usan fármacos, es decir, fármacos anticancerosos, aplicados a células cancerosas diseminadas en todo el cuerpo. Sin embargo, la mayoría de los fármacos contra el cáncer están preparados para suprimir el crecimiento rápido de células cancerosas y, por lo tanto, causarán daño a células cancerosas y posiblemente también a células normales en un grado menor. Mientras tanto, las células normales, como las células sanguíneas, las células epiteliales del tracto gastrointestinal, incluyendo la cavidad oral, las células capilares y las células reproductoras que se dividen o proliferan rápidamente, se ven muy afectadas y producen efectos secundarios como anemia, pérdida de cabello y genitopatía. En casos severos, los fármacos contra el cáncer pueden disminuir la función de la médula y pueden causar infección dentro de 2 a 3 semanas de tratamiento, lo que lleva a la muerte por sepsis. La radioterapia se refiere al tratamiento de la inducción de la apoptosis de tejidos cancerígenos con radiación de alta energía. Este tratamiento es uno de los métodos que permite a un paciente mantener una vida normal, pero puede causar daño a la piel normal en un área local como un efecto secundario de la radiación de alta energía. En los casos de cáncer metastásico, las células madre cancerosas pueden ser resistentes a la radiación y pueden producirse recaídas o metástasis.

Con el fin de superar estas desventajas, los estudios para desarrollar un método de tratamiento de la combinación de radioterapia con quimioterapia o terapia génica se llevan a cabo activamente. Por ejemplo, la publicación de patente coreana publicada 2002-0042606 describe una composición radiosensibilizante que contiene un derivado de N-acetilfingosina y un derivado de dimetilfingosina, la Publicación Publicada a la Patente Coreana No. 2003-0055878 describe un

radiosensibilizador que contiene ceramidas y derivados de la misma y dimetilsfingosina que es un inhibidor de esfingosina quinasa, y la Patente Coreana No. 620751 describe una composición para radiosensibilización, que contiene paeonol y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingredientes activos. Sin embargo, en los casos de combinación de radioterapia con los fármacos anticancerosos descritos anteriormente para mejorar los efectos terapéuticos de la radioterapia, la toxicidad de los fármacos contra el cáncer, tal como inflamación en el sitio de radioterapia, trastornos gástricos, náuseas, vómitos y diarrea, puede ocurrir en además de los efectos secundarios de la radioterapia. Por lo tanto, el uso de fármacos contra el cáncer es limitado. Además, se sabe que debido al medio inmunosupresor, el tumor no puede ser completamente exterminado y el riesgo de recaída es alto.

En consecuencia, se necesita urgentemente el desarrollo de un nuevo tratamiento que sea fácilmente aplicable para tratar el cáncer y capaz de tratar eficazmente el cáncer con menos influencia en los tejidos normales. Según los resultados de estudios recientes, se sabe que una célula cancerosa tiene sus propias características y puede crecer continuamente manteniendo las características. En primer lugar, una célula cancerosa tiene una característica de mantener continuamente una señal de diferenciación. Por ejemplo, la diferenciación celular y la supervivencia mediante el mantenimiento β de una señal de catenina es bien conocida. Una célula normal inhibe la sobreproducción de la señal β de catenina a través de la ubiquitinación de proteínas, mientras que una célula β de cáncer evita la ubiquitinación de catenina y mantiene de forma continua una señal de crecimiento. En segundo lugar, una célula cancerosa tiene un sistema para producir una cantidad excesiva de ácido láctico a través de la glucólisis usando glucosa para producir energía con alta eficiencia. En tercer lugar, una célula cancerosa tiene una característica de evitar la apoptosis. Mediante la activación de poli ADP ribosa polimerasa (PARP), una molécula que escapa de la apoptosis, una célula cancerosa evita la apoptosis con una resistencia a diversos tratamientos dirigidos a genes y mantiene de forma continua la formación de tumores. En cuarto lugar, el cáncer es excelente en la invasión o metástasis y también es capaz de crear su propio entorno por la angiogénesis. Si el cáncer crece continuamente, se produce necrosis alrededor del tumor y el suministro de oxígeno se reduce causando el aumento del factor inducible de hipoxia (HIF)-1 α que se sabe que implica el fenómeno anterior directa o indirectamente.

Dirigiéndose a las características descritas anteriormente del cáncer, se han desarrollado diversos fármacos anticancerosos basados en la regulación del

crecimiento celular y la supresión de metástasis. Sin embargo, los inhibidores de tirosina quinasa que median señales de crecimiento han mostrado resultados de tratamiento insatisfactorios y resistencia a fármacos. En el desarrollo de fármacos contra el cáncer, todavía es difícil encontrar un método para suprimir eficazmente el crecimiento de células cancerosas reguladas por una red de vías de señalización complicadas.

En estas circunstancias, los inventores de la presente descripción estudiaron y trataron de desarrollar un método para suprimir eficazmente el crecimiento de células cancerosas y tratar el cáncer y como resultado, completaron la presente descripción descubriendo que las sales de lactato metálicas capaces de disociar el lactato, lo cual puede perturbar el metabolismo de las células cancerosas y, por tanto, inhibir eficazmente actividades tales como el crecimiento, la invasión y la metástasis de las células cancerosas dentro de las células cancerosas, pueden usarse como ingredientes activos de un fármaco anticanceroso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción se ha hecho en un esfuerzo para proporcionar una composición farmacéutica para tratar cáncer incluyendo sales metálicas de lactato como ingredientes activos.

Además, la presente descripción se ha hecho en un esfuerzo para proporcionar una composición farmacéutica para suprimir metástasis de cáncer incluyendo sales de lactato metálicas como ingredientes activos.

Además, la presente descripción se ha realizado en un esfuerzo por proporcionar una composición alimenticia para mejorar el cáncer, incluyendo sales de lactato metálicas como ingredientes activos.

Además, la presente descripción se ha hecho en un esfuerzo para proporcionar un método para tratar cáncer que comprende administrar sales de lactato metálicas.

Además, la presente descripción se ha hecho en un esfuerzo para proporcionar un método para suprimir metástasis de cáncer que comprende administrar sales de lactato metálicas.

De acuerdo con modalidades ejemplares de la presente descripción, las sales de lactato metálico de la presente descripción no tienen efectos secundarios y perturban el metabolismo en una vía de producción de energía principal para suprimir el crecimiento de células cancerosas, inducir la apoptosis y también suprimir la expresión de un factor que induce resistencia a la radiación, y, por tanto, puede ser ampliamente utilizado para un tratamiento anticanceroso más

eficaz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un diagrama esquemático y un cuadro que compara la estructura y la energía de unión entre el lactato de calcio, el lactato de sodio y el lactato de potasio, teniendo cada uno una estructura molecular similar a la del lactato de calcio.

La figura 2 proporciona imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran el resultado de comparar los niveles de calcio en células de cáncer dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio (CaLa).

La figura 3 es un gráfico que muestra el resultado de comparar los niveles de lactato en células cancerosas dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio (CaLa).

La figura 4 proporciona gráficos que muestran los cambios en el pH intracelular y extracelular de las células cancerosas tratadas con lactato de calcio y el gráfico de la izquierda muestra el cambio en el pH extracelular de las células cancerosas y el gráfico derecho muestra el cambio en el pH intracelular de las células cancerosas.

La parte superior de la figura 5 proporciona imágenes electroforéticas que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de ARNm de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones y la parte inferior de la figura 5 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteínas de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones.

La figura 6 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de la β -catenina total y la β -catenina activada en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones.

La figura 7 es una PCR en tiempo real y una transferencia western muestra el efecto del lactato de calcio en la línea celular de cáncer bajo condiciones hipóxicas. La gráfica muestra los niveles de expresión de ARNm del transportador de glucosa (GLUT)-1 y hexoquinasa (HK)2, que se implicaron en la etapa temprana de la glicolisis y las imágenes de transferencia de Western que muestran los niveles de

expresión de proteína de HK2.

La figura 8 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los efectos del lactato de calcio en los niveles de expresión de proteína de PARP y PARP escindido expresado en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231).

La figura 9 proporciona una imagen de transferencia Western y un gráfico que muestra el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de PARP en líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con lactato de calcio, sulfonamida de indano (IS) como inhibidor de anhidrasa carbónica o ácido cinámico (CA) como un inhibidor de MCT-4, que es una vía de salida de lactato, individualmente o en combinación.

La figura 10 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de PARP en líneas celulares de melanoma humano (SKMEL-02 y SKMEL-28) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones.

La figura 11a proporciona imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran los cambios en los niveles de expresión de proteína de LDH-B en líneas celulares de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 11b proporciona imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la absorbancia de fluorescencia de la línea celular de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 11c proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los niveles de desarrollo de fluorescencia dependiendo de los niveles de expresión de la proteína de LDH-B.

La figura 12 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de piruvato en las células cancerosas dependiendo del tratamiento con lactato de calcio.

La figura 13a proporciona imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran cambios en los niveles de expresión de PDH en las líneas celulares de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 13b proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los niveles de desarrollo de fluorescencia de PDH dependiendo del tratamiento con lactato de calcio.

La figura 14a proporciona una gráfica de análisis cuantitativo que muestran los cambios en la concentración de α -KG en las líneas celulares de cáncer con el tratamiento de lactato de calcio en condiciones normales. La figura 14a proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los cambios en la concentración de α -KG en líneas celulares de cáncer con tratamiento con lactato de calcio bajo un medio libre de glutamina.

La figura 15 (parte superior) proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con o sin el tratamiento con lactato de calcio 2.5 mM bajo normoxia o hipoxia, y la parte inferior de la figura 15 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con 0.5 mM, 1.5 mM y 2.5 mM de tratamiento de lactato de calcio bajo condiciones de hipoxia.

La figura 16a proporciona gráficos de análisis cuantitativos que muestran el resultado de la medición de los niveles de expresión de ARNm de VEGF en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con o sin el lactato de calcio 2.5 mM bajo normoxia o condición de hipoxia. La figura 16b proporciona gráficos de análisis cuantitativos que muestran el resultado de la medición de los niveles de expresión proteica de VEGF en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con o sin el lactato de calcio 2.5 mM bajo normoxia o condición de hipoxia.

La figura 17 son imágenes de fluorescencia que muestran los niveles de formación de tubos en células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Las HUVEC se cultivaron usando el medio de líneas celulares de cáncer cultivadas con diferentes concentraciones de lactato de calcio.

La figura 18 proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer colorrectal, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio.

La figura 19 proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer de mama, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio.

La figura 20 proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de melanoma, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio.

La figura 21a proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer de mama (MCF-7) dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio. La figura 21b proporciona análisis de citometría de flujo que muestran la tasa de supervivencia de una línea celular de cáncer de mama (MCF-7) que no se trató con lactato de calcio. La figura 21c proporciona análisis de citometría de flujo que

muestran la tasa de supervivencia de una línea celular de cáncer de mama (MCF-7) que se trató con lactato de calcio. La figura 21d proporciona fotos que muestran el resultado de confirmar la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB231) dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio. La figura 21e proporciona análisis de citometría de flujo que muestran la tasa de supervivencia de una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB231) que no se trató con lactato de calcio. La figura 21f proporciona análisis de citometría de flujo que muestran la tasa de supervivencia de una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB231) que se trató con lactato de calcio.

La figura 22 proporciona imágenes microscópicas que muestran el cambio de esfera de la línea de células madre de cáncer colorrectal a partir del tratamiento con lactato de calcio.

La figura 23 proporciona imágenes representativas y análisis cuantitativo (izquierda: HCT-116, medio: HT-29, derecha: DLD-1) que muestra la comparación de una capacidad de formación de colonias de líneas celulares de cáncer colorrectal dependiendo de la concentración de lactato de calcio.

La figura 24a proporciona gráficos y cuadros que muestran el resultado de la comparación de una capacidad formadora de colonias de líneas celulares de melanoma SKMEL-02 dependiendo de la concentración de lactato de calcio. La figura 24b proporciona un gráfico y un cuadro que muestran el resultado de la comparación de una capacidad formadora de colonias de líneas celulares de melanoma SKMEL-28 dependiendo de la concentración de lactato de calcio.

La figura 25a proporciona gráficos de análisis cuantitativos que muestran el resultado de comparar la tasa de supervivencia de líneas celulares de cáncer colorectal tratadas con lactato de calcio, 5-indano sulfonamida (IS) como inhibidor de anhidrasa carbónica o ácido cinámico (CA) como un inhibidor de MCT-4, que es una vía de salida de lactato, individualmente. La figura 25b proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra el resultado de comparar la tasa de viabilidad de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con lactato de calcio, 5-IS como un inhibidor de la anhidrasa carbónica, o CA como un inhibidor de MCT-4, que es una vía de salida de lactato, en combinación.

La figura 26 proporciona gráficos de análisis cuantitativos que muestran el resultado de comparar los efectos del lactato de calcio sobre la tasa de supervivencia de líneas celulares de cáncer colorrectal cultivadas en las placas adhesivas ultrabajas.

La figura 27 es una ilustración esquemática del esquema experimental para el tratamiento con lactato de calcio usando modelos animales.

La figura 28 es una imagen que muestra el cambio en los niveles de

expresión de las proteínas PARP extraídas del tejido tumoral del modelo de xenoinjerto animal dependiendo del método de tratamiento del lactato de calcio y si se trató o no con lactato de calcio.

La figura 29 proporciona fotos que muestran el cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α o GAPDH dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio, en proteínas extraídas de tejidos tumorales de los modelos animales en los que se administró por vía oral lactato de calcio.

La figura 30 proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen del tumor dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio en un modelo animal en el que se administró oralmente lactato de calcio 2.5 mM.

La figura 31 proporciona transferencias de Western que muestran el cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α o GAPDH en la proteína extraída de tejidos tumorales del modelo de xenoinjerto animal dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio alrededor del tumor.

La figura 32 proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen del tumor dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio 2.5 mM alrededor de un tumor.

La figura 33 proporciona imágenes representativas que muestran el cambio en la morfología tumoral de un modelo animal dependiendo de la inyección de lactato de calcio 2.5 mM alrededor de un tumor.

La figura 34 proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen del tumor dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio, en un modelo animal en el que se inyectó subcutáneamente 25 mM de lactato de calcio alrededor de la región interescapular.

La figura 35 proporciona imágenes representativas que muestran el cambio en la morfología del tumor en un modelo animal dependiendo del tratamiento con lactato de calcio.

La figura 36 es una ilustración esquemática de un esquema experimental para el tratamiento combinado con radiación y lactato de calcio usando modelos animales.

La figura 37a proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de cáncer animal, que se preparó implantando la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 en el flanco dependiendo de si se trató con radiación y lactato de calcio individualmente o en combinación. La figura 37b proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de cáncer animal, que se preparó implantando una línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 en el flanco

dependiendo de si se trató con radiación y lactato de calcio individualmente o en combinación.

La figura 38a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib μM , 2.5 μM , y 5 μM , solo o en combinación. La figura 38b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib 1 μM , 2.5 μM , y 5 μM , solo o en combinación.

La figura 39a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-116) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib 1 μM , 2.5 μM , y 5 μM , solo o en combinación. La figura 39b muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-116) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib 1 μM , 2.5 μM , y 5 μM , solo o en combinación.

La figura 40a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μM , 5 μM , y 10 μM , solo o en combinación. La figura 40b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de la colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μM , 5 μM , y 1 μM , solo o en combinación.

La figura 41a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT-116) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μM , 5 μM , y 10 μM , solo o en combinación. La figura 41b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT-116) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μM , 5 μM , y 10 μM , solo o en combinación.

La figura 42a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 2.5 nM, 0.63 nM, 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 42b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación.

La figura 43a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 43b muestra el resultado de la comparación de la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación.

La figura 44a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Gefitinib 1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. La figura 44b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Gefitinib 1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación.

La figura 45a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep3B) con lactato de calcio 2.5 mM y Sorafenib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. La figura 45b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep3B) con lactato de calcio 2.5 mM y Sorafenib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación.

La figura 46a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Irinotecan 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 46b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Irinotecan 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación.

La figura 47a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Erlotinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 47b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Erlotinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación.

La figura 48a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano

(HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Sunitinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 48b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29) con lactato de calcio 2.5 mM y Sunitinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación.

La figura 49a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y metotrexato 5 nM, 10 nM y 20 nM, solo o en combinación. La figura 49b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y metotrexato 5 nM, 10 nM y 20 nM, solo o en combinación.

La figura 50a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Carboplatino 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. La figura 50b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Carboplatino 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación.

La figura 51a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Docetaxel 0.6 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 51b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con 2.5 mM de lactato de calcio y Docetaxel 0.6 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación.

La figura 52a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Lapatinib 2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M, solo o en combinación. La figura 52b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Lapatinib 2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M, solo o en combinación.

La figura 53a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) con lactato de calcio 2.5 mM y Everolimus 0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM, solo o en combinación. La figura 53b muestra el resultado de comparar la supresión de la

formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) con lactato de calcio 2.5 mM y Everolimus 0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM, solo o en combinación.

La figura 54a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Trastuzumab 0.23 µg/ml, 0.45 µg/ml, y 1.8 µg/ml, solo o en combinación. La figura 54b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Trastuzumab 0.23 µg/ml, 0.45 µg/ml, y 1.8 µg/ml, solo o en combinación.

La figura 55a Muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Oxaliplatino 1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM, solo o en combinación. La figura 55b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Oxaliplatino 1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM, solo o en combinación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. Las modalidades ilustrativas descritas en la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones no tienen por objeto ser limitativas. Pueden utilizarse otras modalidades, y pueden hacerse otros cambios, sin apartarse del espíritu o alcance de la materia presentada aquí.

Los inventores de la presente descripción han llevado a cabo diversos estudios para desarrollar un método para tratar el cáncer mediante la supresión efectiva del crecimiento y la metástasis de las células cancerosas y prestar atención a la vía metabólica de las células cancerosas. En las células cancerosas, la energía se produce a partir de la glucosa a través de la glucólisis en la que el oxígeno no se utiliza, en lugar de a través de la cadena respiratoria mitocondrial con una gran cantidad de oxígeno. Durante el metabolismo del cáncer, el lactato se produce en gran cantidad. Sin embargo, la acidez del lactato causa ineficiencia en la supervivencia de las células cancerosas. Así, el exceso de lactato se exporta al exterior de las células. Por esta razón, se asumió que mediante la administración artificial de una sal metálica de lactato a un paciente de cáncer y la acumulación de lactato dentro de las células cancerosas, el lactato acumulado puede causar

trastorno metabólico del cáncer o desarrollar un microambiente de cáncer desfavorable para la supervivencia del cáncer y, de este modo causando daños mortales.

Por consiguiente, se seleccionó una sal metálica de lactato como material para perturbar el metabolismo de las células cancerosas. Esto se debe a que se esperaba que, dado que la glucosa se convierte en piruvato a través de la glucólisis y luego forma lactato, si el lactato se puede acumular en las células cancerosas, la glucólisis puede ralentizarse o detenerse. Sin embargo, el lactato puede degradarse fácilmente en el cuerpo y, por lo tanto, no puede ser transportado eficazmente a las células cancerosas. Por lo tanto, se esperaba que el lactato no se pudiera degradar fácilmente en un ambiente extracelular, pero se puede introducir fácilmente en las células y degradarse eficazmente en ellas usando una sal metálica de lactato.

Mientras tanto, los inventores de la presente descripción consideraron que en el caso de usar una sal metálica de lactato que incluye un componente metálico que no puede ser metabolizado fácilmente en el cuerpo, el componente metálico puede causar un efecto secundario debido a las características de un fármaco anticanceroso que puede ser administrado frecuentemente en una gran cantidad y, así, seleccionado entre diversas sales de lactato metálicas una sal metálica de lactato de lactato de sodio, lactato de potasio y lactato de calcio, que tiene una excelente fuerza de unión con respecto al lactato y una excelente eficacia de liberación de lactato a una célula cancerosa sin contener un componente metálico que no pueda metabolizarse fácilmente en el cuerpo. Como resultado, se confirmó que el lactato de calcio tiene la fuerza de unión más alta con respecto al lactato y la mayor eficacia de liberación de lactato a una célula cancerosa, y finalmente se seleccionó el lactato de calcio.

Como resultado de la administración del lactato de calcio seleccionado a las células cancerosas, se confirmó que los niveles de lactato, LDH-B (lactato deshidrogenasa B), que afecta al metabolismo del lactato, piruvato, PDH (piruvato deshidrogenasa), que afecta al metabolismo de piruvato y α -KG (α -cetoglutarato) en las células se incrementan; los niveles de β -catenina, como un factor de crecimiento del cáncer, PARP, que suprime el daño del ADN intracelular, HIF-1 α (factor inducible de hipoxia 1 α) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), que afectan a las metástasis de las células cancerígenas, la invasión y la angiogénesis en las células se disminuyen; y los niveles de crecimiento, metástasis (migración), y la formación de tubos de las células cancerosas se disminuyen.

Además, la actividad anticancerígena del lactato de calcio se midió

usando modelos animales y se confirmó que la administración de lactato de calcio suprimía el crecimiento de células de cáncer en modelos animales.

Además, en caso de administración en combinación con radiación convencional, se confirmó que se puede obtener el efecto anticancerígeno equivalente con una cantidad disminuida de radiación en comparación con el caso convencional. Además, en caso de administración a líneas celulares de cáncer relevantes en combinación con diversos tipos de fármacos anticancerosos bien conocidos, se confirmó que se puede obtener un efecto anticancerígeno más alto con una concentración disminuida de los fármacos contra el cáncer en comparación con un caso de únicamente administración.

La mayoría de las sales metálicas de lactato que muestran tales actividades anticancerígenas pueden ser metabolizadas en el cuerpo y conocidas como no tener efectos secundarios. De este modo, las sales metálicas de lactato pueden usarse como ingredientes activos de fármacos anticancerosos o alimentos saludables con seguridad y excelente actividad anticancerígena. Los efectos anticancerosos de estas sales metálicas de lactato no se han conocido antes, pero han sido demostrados primero por los inventores de la presente descripción.

Una modalidad ejemplar de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer incluyendo sales metálicas de lactato como ingredientes activos.

El término "sales metálicas de lactato" aquí utilizado se refiere a compuestos producidos o sintetizados en forma de ácido láctico unido a un ion metálico.

En la presente descripción, si las sales de lactato metálicas se administran en una célula cancerosa, las sales de lactato metálicas se usan para disociar el lactato y así aumentar la concentración de lactato en la célula cancerosa. Las sales de lactato metálicas utilizadas como ingredientes activos de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de acuerdo con la presente descripción no están particularmente limitadas siempre que puedan perturbar el metabolismo de una célula cancerosa. En un ejemplo, el lactato de calcio, el lactato de zinc, el lactato de magnesio, el lactato de sodio, el lactato de potasio, el lactato ferroso, el lactato de cromo, el lactato de cobre y el lactato de manganeso capaces de formar un compuesto estable fuera de una célula y de disociar lactato y aumentar así la concentración de lactato en una célula cancerosa pueden usarse individualmente o en combinación. En otro ejemplo, el lactato de calcio, el lactato de sodio y el lactato de potasio capaces de formar un compuesto estable fuera de una célula y de disociar el lactato y así aumentar la concentración de lactato en una célula cancerosa sin contener un componente metálico que no pueda metabolizarse

fácilmente en el cuerpo pueden utilizarse individualmente o en combinación. En aún otro ejemplo, el lactato de calcio capaz de formar un compuesto estable fuera de una célula y de disociar el lactato y de este modo aumentar la concentración de lactato en una célula cancerosa con una excelente eficacia de suministro a la célula cancerosa sin contener un componente metálico que no pueda metabolizarse fácilmente en el cuerpo se puede usar.

En la presente descripción, todos los lactatos de calcio, lactato de sodio y lactato de potasio se sintetizan como sales metálicas de lactato, y se confirmó que estas sales metálicas de lactato se pueden disociar a lactato en una célula cancerosa. En particular, se utilizó lactato de calcio que tenía la mayor eficacia de liberación de lactato para demostrar diversas actividades anticancerígenas.

Sin embargo, el lactato de calcio es sólo un ejemplo de sales metálicas de lactato proporcionadas en la presente descripción. Las sales metálicas de lactato proporcionadas en la presente descripción no se limitan al lactato de calcio y es obvio que pueden usarse diversas sales metálicas de lactato como ingredientes activos de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de acuerdo con la presente descripción.

Las sales metálicas de lactato pueden mostrar una actividad anticancerosa mejorada en caso de administración en combinación con un fármaco anticancerígeno convencional. Esto se debe a que el fármaco anticancerígeno convencional no tiene un mecanismo implicado en la glicolisis de una célula cancerosa. Por lo tanto, un fármaco anticanceroso que puede administrarse en combinación con la composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer proporcionada en la presente descripción no está particularmente limitado, siempre y cuando no esté directamente implicado en la glicolisis de una célula cancerosa. Por ejemplo, Imatinib, 5-FU (5-Fluorouracilo), Irinotecan, Sunitinib, Oxaliplatino, Paclitaxel, Lapatinib, Trastuzumab (Herceptin), Gefitinib, Erlotinib, Metotrexato, Carboplatino, Docetaxel, Everolimus y Sorafenib, fármacos anticancerígenos bien conocidos, 5-indano sulfonamida (IS), que es un inhibidor de la anhidrasa carbónica conocido por tener actividad anticancerígena, y ácido cinámico (CA), que es un inhibidor del transportador monocarboxilato.

Además, las sales metálicas de lactato disminuyen la expresión de PARP, HIF-1 α y VEGF que dan una resistencia de células cancerígenas a la radiación en caso de radiación. De este modo, en el caso de la administración de las sales metálicas de lactato en combinación con radiación, las sales de lactato metálicas mejoran la actividad anticancerígena de la radiación. Por lo tanto, es posible obtener un efecto anticancerígeno equivalente con una cantidad disminuida de radiación en comparación con el caso convencional. En este caso, la cantidad de

radiación no está particularmente limitada, y puede ser de 2 a 10 Gy por día. La radiación puede ser irradiada una vez al día, o puede ser irradiada durante varios días dividiendo la cantidad de radiación.

El término "lactato de calcio" se refiere a un tipo de sales metálicas de lactato y representado por $C_6H_{10}O_6Ca \cdot 5H_2O$ en el que el ion de calcio está unido al lactato. El lactato de calcio está en forma de polvo o gránulos blancos a temperatura ambiente, anhidro en una condición de calentamiento a $120^{\circ}C$, y tiene una solubilidad de 5% (p/v). Además, el lactato de calcio tiene una excelente biodisponibilidad y absorción corporal y no se ha conocido que tenga un efecto secundario y, por lo tanto, se ha usado principalmente como un potenciador de calcio o un regulador del pH de los alimentos.

En la presente descripción, el lactato de calcio se puede usar como un ejemplo de sales de lactato metálicas que son ingredientes activos de la composición farmacéutica para tratar el cáncer. Dado que el calcio unido al lactato es más absorbible en las células cancerosas que las células normales, el lactato de calcio tiene la ventaja de una eficacia relativamente más alta del suministro de lactato a las células cancerosas que otros tipos de sales metálicas de lactato.

Los cánceres que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción no están particularmente limitados siempre que su crecimiento, invasión y metástasis puedan suprimirse perturbando su metabolismo. En un ejemplo, los cánceres sólidos tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de hueso, linfoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de riñón y melanoma, de los cuales el crecimiento, la invasión y la metástasis pueden ser suprimidos por la perturbación de la glucólisis se pueden incluir. En otro ejemplo, pueden incluirse el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el melanoma, cuyo crecimiento, invasión y metástasis pueden suprimirse mediante un tratamiento con sales de lactato metálicas.

Según una modalidad ejemplar de la presente descripción, con el fin de sintetizar sales metálicas de lactato, entre diversas sales de lactato metálicas, cada uno de lactato de calcio, lactato de sodio y lactato de potasio, que no contiene metal que puede ser dañino en el cuerpo, fue sintetizado. A continuación, mediante la comparación de la energía de unión y la eficiencia de liberación de lactato a una célula cancerosa, se confirmó que el lactato de calcio tiene la fuerza de unión más alta con respecto al lactato y la mayor eficiencia de liberación de lactato a una célula cancerosa, y el lactato de calcio se selecciona finalmente (figura 1).

En el caso de tratar una célula cancerosa con el lactato de calcio

seleccionado, se confirmó que la concentración de calcio (figura 2) y la concentración de lactato (figura 3) en la célula cancerosa aumentó y el pH en la célula disminuyó (figura 4). Además, se confirmó que la expresión de β -catenina como un factor de crecimiento del cáncer se suprimió de acuerdo con la decodificación del gen (figura 5), Y tanto la β -catenina como la β -catenina activada disminuyeron en la expresión de la proteína a medida que aumentaba la concentración de lactato de calcio (figura 6). Además, se confirmó que el lactato de calcio redujo la expresión proteica de PARP, que repara el daño intracelular del ADN, en una línea celular de cáncer de mama (figura 8), una línea celular de cáncer colorrectal (figura 9), y una línea celular de melanoma (figura 10); aumentó la expresión proteica de LDH-B (lactato deshidrogenasa B), que afecta al metabolismo del lactato intracelular (figuras 11a, 11b y 11c), aumentó el nivel de piruvato (figura 12), aumentó la expresión proteica de PDH (piruvato deshidrogenasa) (figuras 13a y 13b), y aumentó el nivel de α -KG (α -cetoglutarato) (figuras 14a y 14b); suprimió la expresión de proteína de HIF-1 α (factor inducible por hipoxia 1 α) (figura 15) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (figuras 16a y 16b), que afecta a la metástasis, la invasión y la angiogénesis de una célula cancerosa, y suprime los niveles de formación de tubos de HUVEC (figura 17); migración celular suprimida de una línea celular de cáncer colorrectal (figura 18), una línea celular de cáncer de mama (figura 19) y una línea celular de melanoma (figura 20); aumentó la tasa de apoptosis celular de una línea celular de cáncer de mama (figuras 21a, 21b, 21c, 21d y 21e) y una línea celular de cáncer colorrectal (figura 22); inhibía la capacidad de formación de colonias de una línea celular de cáncer colorrectal (figura 23) y una línea celular de melanoma (figuras 24a y 24b); y una mayor eficacia anticancerígena en caso de administración en combinación con un fármaco anticanceroso convencional (figuras 25a y 25b).

Además, como resultado del ensayo de la actividad anticancerígena del lactato de calcio usando modelos animales, se confirmó que en un modelo animal de ratón preparado con diseminación de una línea celular de cáncer colorrectal, aumentó la actividad de degradación de PARP (figura 28), las expresiones de HIF-1 α y VEGF se suprimieron (figuras 29 y 31), se suprimió el crecimiento del tumor (figuras 30, 32 y 34), y el volumen del tumor disminuyó y la angiogénesis también disminuyó (figuras 33 y 35). Mientras tanto, como resultado de la administración de lactato de calcio en combinación con radiación, se confirmó que el crecimiento del tumor disminuyó más eficazmente (figuras 37a y 37b).

Además, en el caso de la administración de lactato de calcio en combinación con diversos fármacos contra el cáncer usados para tratar diversos

cánceres, se confirmó que el crecimiento del tumor se suprimió más eficazmente en comparación con el caso en el que los fármacos contra el cáncer se administraron solos (figuras 38a, 38b a 55a, y 55b).

La composición farmacéutica de la presente descripción puede prepararse en forma de una composición farmacéutica para tratar el cáncer y puede incluir además vehículos, excipientes o diluyentes apropiados que se usan generalmente en la preparación de una composición farmacéutica. Específicamente, la composición farmacéutica se puede formular, según un método tradicional, en formas de dosificación oral tales como polvo, gránulo, tableta, cápsula, suspensión, emulsión, jarabe, aerosol, parche oral, etc., preparación externa, parche para uso externo, supositorio o en forma de soluciones inyectables estériles. En la presente descripción, los vehículos, excipientes y diluyentes que pueden incluirse en la composición farmacéutica pueden ser lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho acasia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa amorfa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La formulación de la composición puede implicar el uso de diluyentes o excipientes tales como rellenos, agentes de carga, aglutinantes, agentes humectantes, desintegrantes, agentes tensoactivos, etc. Las formulaciones sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, depósitos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, parches orales, etc. Las formulaciones sólidas pueden prepararse mezclando al menos un excipiente, tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa o gelatina, etc., con los extractos y fracciones de los mismos. Además de tales excipientes generales, también pueden usarse lubricantes tales como estearato de magnesio o talco. Las formulaciones líquidas para administración oral pueden incluir suspensiones, soluciones para uso interno, emulsiones, jarabes, etc. Además de diluyentes generales tales como agua y parafina líquida, pueden utilizarse diferentes excipientes tales como agentes humectantes, sabores, fragancias, conservas, etc., se pueden incluir. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles, solventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas, parches para uso externo, o supositorios. Las soluciones no acuosas y las suspensiones pueden incluir propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como etilolato, etc. La base para supositorios puede incluir witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, glicerogelatina, etc.

La cantidad de las sales de lactato metálicas incluidas en la composición farmacéutica de la presente descripción puede ser, pero no está

particularmente limitada a, entre 0.0001% en peso y 50% en peso, o más preferiblemente entre 0.01% en peso y 20% en peso, basado en el peso total de la composición final. La concentración de las sales de lactato metálicas incluidas en una dosis única de la composición farmacéutica puede ser de 2.5 mM a 25 mM.

La composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz, y tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para tratar o prevenir enfermedades, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico o prevención. El nivel de dosificación eficaz se puede determinar dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la actividad del fármaco, la edad del paciente, el peso corporal, la salud y el sexo, la sensibilidad al fármaco, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción de la composición de la presente descripción, duración del tratamiento, fármacos usados simultáneamente o en combinación con la composición de la presente descripción, y otros factores conocidos en el campo médico. La composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse sola o en combinación con otros fármacos o componentes anticancerosos públicamente conocidos por tener actividad anticancerígena. Es importante administrar la composición en la cantidad mínima que puede exhibir el efecto máximo sin causar efectos secundarios, teniendo en cuenta todos los factores anteriores.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente descripción puede ser determinada por los expertos en la técnica en consideración al propósito de uso, gravedad de la enfermedad, edad del paciente, peso corporal, sexo y anamnesis, el tipo de material usado como un ingrediente activo, o similar. La composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 0.1 ng a aproximadamente 1,000 mg/kg por adulto, o preferiblemente de 1 ng a aproximadamente 100 mg/kg por adulto, y la frecuencia de administración de la composición de la presente descripción puede ser, pero no se limita particularmente, a una o varias dosis divididas al día. La dosis o la frecuencia de administración no limita el alcance de la presente descripción de ninguna manera.

Otra modalidad ejemplar de la presente descripción proporciona un método de tratamiento de cáncer que incluye la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto que tiene cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye todos los mamíferos incluyendo ratones, ganado, y seres humanos, y peces de

granja que tienen cáncer, sin limitaciones.

El término "tratamiento" utilizado en el presente documento se refiere a todas las actividades para aliviar o mejorar los síntomas de cáncer administrando la composición farmacéutica que incluye las sales de lactato metálicas como ingredientes activos de la presente descripción a un sujeto que tiene cáncer.

En el método de tratamiento de cáncer de la presente descripción, los tipos de cáncer a tratar son los mismos que se han descrito anteriormente.

La composición puede administrarse en una forma de dosificación única o múltiple. En este caso, la composición puede formularse en líquido, polvo, aerosol, inyección, transfusión de fluido (goteo intravenoso), cápsula, píldora, tableta, supositorio o parche.

La composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de la presente descripción se puede administrar por cualquiera de las vías comunes siempre que sea capaz de alcanzar un tejido objetivo.

La composición farmacéutica de la presente descripción se puede administrar, pero no se limita particularmente, por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, en forma de un parche transdérmico, por vía oral, intranasal, intrapulmonar o intrarrectal dependiendo del propósito. Sin embargo, la composición farmacéutica puede administrarse en una forma no formulada para administración oral, y puesto que las sales metálicas de lactato pueden ser desnaturalizadas por ácido gástrico tras la administración oral, los ingredientes activos de una composición para administración oral deben revestirse o formularse para protección contra la degradación en el estómago o administrada por vía oral en forma de parche para administración oral. Además, la composición puede administrarse utilizando un determinado aparato capaz de transportar los ingredientes activos dentro de una célula objetivo.

Aún otra modalidad ejemplar de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para tratar cáncer incluyendo sales metálicas de lactato y fármaco anticanceroso como ingredientes activos.

Como se ha descrito anteriormente, las sales de lactato metálicas proporcionadas en la presente descripción pueden mostrar una actividad anticancerosa mejorada en los casos de administración en combinación con un fármaco anticancerígeno convencional. Esto se debe a que el fármaco anticancerígeno convencional no tiene un mecanismo implicado en la glicolisis de una célula cancerosa. Por lo tanto, un fármaco anticanceroso que incluye una sal metálica de lactato proporcionada en la presente descripción y un ingrediente activo de fármacos anticancerosos públicamente conocidos pueden utilizarse más eficazmente para tratar el cáncer.

En el presente documento, las sales metálicas de lactato, los fármacos anticancerosos públicamente conocidos, el cáncer al que puede aplicarse la composición farmacéutica para tratar el cáncer, la dosificación, el método de administración y similares son los mismos que se han descrito anteriormente.

Todavía otra modalidad ejemplar de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para suprimir metástasis de cáncer incluyendo sales metálicas de lactato como ingredientes activos.

Las sales de lactato metálicas proporcionadas en la presente descripción pueden suprimir diversas características que pueden inducir metástasis de células cancerosas, tales como metástasis, invasión, angiogénesis de células cancerosas, formación de tubos, migración celular, capacidad para formar colonias, etc., y, por tanto, pueden usarse como ingredientes activos de una composición farmacéutica para suprimir la metástasis del cáncer.

En el presente documento, un cáncer objetivo suprimido por metástasis es el mismo que se ha definido anteriormente. Por ejemplo, la composición farmacéutica para suprimir metástasis de cáncer puede usarse para suprimir la aparición de uno o más cánceres metastásicos seleccionados del grupo que consiste en cáncer de pulmón metastásico, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de hueso, linfoma, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón y melanoma.

De acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente descripción, cuando se trataron varias células cancerosas con lactato de calcio como una especie de sales de lactato metálico proporcionadas en la presente descripción, se confirmó que las expresiones de proteínas de HIF-1 α (factor inducible de hipoxia 1 α) (figura 15) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (figura 16), que afectan a la metástasis, invasión y angiogénesis de una célula cancerosa, y los niveles de formación de tubos de HUVEC (figura 17) fueron suprimidos; migraciones celulares de una línea celular de cáncer colorrectal (figura 18), una línea celular de cáncer de mama (figura 19) y una línea celular de melanoma (figura 20) fueron suprimidos; las tasas de apoptosis celular de una línea celular de cáncer de mama (figura 21) y una línea celular de cáncer colorrectal (figura 22) se incrementaron; y las capacidades de formación de colonias de una línea celular de cáncer colorrectal (figura 23) y una línea celular de melanoma (figura 24) se inhibieron.

Todavía otra modalidad ejemplar de la presente descripción proporciona una composición alimenticia para mejorar el cáncer incluyendo sales metálicas de lactato como ingredientes activos.

Las sales metálicas de lactato se han utilizado generalmente para el

metabolismo in vivo, y se ha certificado que el lactato de calcio no tiene efectos secundarios y se ha utilizado como aditivo alimentario oficial. De este modo, las sales metálicas de lactato se pueden tomar en forma de un alimento que se puede comer diariamente y puede promover la mejora del cáncer. En este caso, la cantidad de sales metálicas de lactato incluidas en el alimento puede ser, pero no está particularmente limitada a, entre 0.001% en peso y 10% en peso, o entre 0.1% en peso y 1% en peso, basado en el peso total de la composición alimenticia. Si el alimento es una bebida, las sales metálicas de lactato pueden incluirse en una relación de 1 g a 10 g o de 2 g a 7 g por 100 ml.

Además, la composición puede incluir además componentes adicionales que se han usado típicamente en una composición alimenticia para mejorar el olor, el sabor, la apariencia, etc., por ejemplo vitaminas A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, niacina, biotina, folato, ácido pantoténico, etc. Además, la composición puede incluir además minerales tales como Zn, Fe, Ca, Cr, Mg, Mn, Cu, etc. Además, la composición puede incluir además aminoácidos tales como lisina, triptófano, cisteína, valina, etc. Además, la composición puede incluir además aditivos alimentarios tales como conservantes (sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido salicílico, acetato de hidrógeno sódico, etc.), desinfectantes (blanqueo en polvo, polvo de blanqueo superior, hipoclorito de sodio, etc.), antioxidantes (butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), etc.), agentes colorantes (color alquitrán, etc.), agentes reveladores de color (nitrito de sodio, etc.), agentes blanqueantes (sulfito sódico), condimentos (glutamato monosódico (MSG), etc.), edulcorantes (dulcina, ciclamato, sacarina, sodio, etc.), aromatizantes (vanilina, lactonas, etc.), agentes de hinchamiento (alumbre, tartrato de potasio D-hidrógeno, etc.), fortificantes, emulsionantes, espesantes (pastas adhesivas), agentes formadores de película, agentes de base de goma, agentes antiespumantes, solventes, mejoradores, etc. Los aditivos alimentarios pueden seleccionarse de acuerdo con el tipo de alimento y utilizarse en una cantidad apropiada.

Mientras tanto, los alimentos funcionales para mejorar el cáncer se pueden fabricar usando la composición alimenticia para mejorar el cáncer incluyendo las sales metálicas de lactato.

Específicamente, los alimentos procesados capaces de mejorar el cáncer se pueden fabricar usando la composición alimenticia. Ejemplos de los alimentos procesados pueden fabricarse como alimentos funcionales en forma de galletas, bebidas, bebidas alcohólicas, alimentos fermentados, alimentos enlatados, alimentos procesados con leche, alimentos procesados con carne o fideos. Aquí, ejemplos de las galletas incluyen bizcochos, pies, pasteles, panes, caramelos, jaleas, gomitas, cereales (sustitutos de comidas tales como copos de grano).

Ejemplos de bebidas incluyen agua potable, refrescos carbonatados, bebidas isotónicas funcionales, jugos (por ejemplo, jugos de manzana, pera, uva, aloe, mandarina, melocotón, zanahoria, jugos de tomate, etc.), bebidas de arroz dulce, etc. Ejemplos de bebidas alcohólicas incluyen vino de arroz refinado, whisky, soju (licores destilados coreanos), cerveza, licores, vino de frutas, etc. Ejemplos de alimentos fermentados incluyen salsa de soya, pasta de frijoles, pasta de pimiento rojo, etc. Ejemplos de alimentos enlatados incluyen alimentos enlatados del mar (por ejemplo, atún en conserva, caballa, lana de caballa, concha, etc.), alimentos enlatados de ganado (carne enlatada, cerdo, pollo, pavo, etc.) y alimentos enlatados agrícolas (maíz enlatado, melocotón, piña), etc.). Ejemplos de alimentos procesados con leche incluyen queso, mantequilla, yogur, etc. Ejemplos de alimentos procesados con carne incluyen chuletas de cerdo, chuletas de carne, chuletas de pollo, salchichas, cerdo agridulce, pepitas, neobiani, etc. Ejemplos de fideos incluyen fideos secos, fideos sencillos, ramen, fideos udon, fideos fríos coreanos, fideos frescos sellados y empacados, etc. Además, la composición puede usarse para la fabricación de alimentos de retorta, sopas, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "alimento funcional", que tiene el mismo significado que el término "alimento para uso especial de salud (FoSHU)", se refiere a un alimento con altos efectos en el tratamiento médico y médico, procesado de manera eficiente para exhibir una función de modulación del cuerpo, así como proporcionar nutrientes. El alimento funcional puede fabricarse en diversas formas, incluyendo tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, líquidos, pastillas, etc., con el fin de obtener efectos útiles para la mejora del cáncer.

A continuación, la presente descripción se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente pero no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

EJEMPLO 1

Preparación de sal metálica de lactato

Se hizo reaccionar carbonato de calcio, carbonato de sodio o carbonato de potasio con lactato para obtener soluciones de sal metálica de lactato (lactato de calcio, lactato de sodio o lactato de potasio), respectivamente. Cada una de ellas se filtró, se secó y se pulverizó para obtener una sal de metal de lactato (lactato de calcio, lactato de sodio o lactato de potasio) en forma de polvo. A continuación, se analizó la estructura y la energía de unión de las sales metálicas de lactato

obtenidas (lactato de calcio, lactato de sodio o lactato de potasio) (figura 1).

La figura 1 muestra un diagrama esquemático y un cuadro que compara la estructura y la energía de unión entre el lactato de calcio, el lactato de sodio y el lactato de potasio, teniendo cada uno una estructura molecular similar a la del lactato de calcio. Como se puede ver en la figura 1, se confirmó que el lactato de calcio tiene una energía de unión relativamente alta en comparación con el lactato de sodio y el lactato de potasio.

A continuación, se llevaron a cabo los experimentos que usaban lactato de calcio con una energía de unión relativamente alta.

EJEMPLO 2

Efecto del lactato de calcio en el microambiente tumoral

Después del tratamiento de una célula cancerosa con lactato de calcio, se analizó el cambio en la concentración de calcio, el cambio en la concentración de lactato y el cambio en el pH en la célula para predecir los niveles de afluencia de lactato de calcio.

EJEMPLO 2-1

Cambio en el nivel de calcio

Cada una de las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) con el número de células de 5×10^5 células cultivadas en un medio de cultivo de células cancerígenas (medio RPMI1640 incluyendo FBS al 10% y penicilina al 1%/estreptomycin) a 37°C con CO₂ al 5% se trató con lactato de calcio 2.5 mM y luego se cultivó durante 24 horas. Las células de cáncer cultivadas se trataron con indicador de calcio 10 μ M Fluo-3/AM y 25% de Pluronic F-127, se hicieron reaccionar a 37°C durante 30 minutos, se aplicaron con sondas de fluorescencia y luego se fotografiaron con un microscopio confocal (figura 2). En este caso, las células cancerosas no tratadas con lactato de calcio se usaron como grupos control.

La figura 2 proporciona imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran el resultado de comparar los niveles de calcio en células de cáncer dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio (CaLa). Como puede observarse en la figura 2, se confirmó que la concentración de calcio se incrementó en células cancerosas tratadas con lactato de calcio.

EJEMPLO 2-2

Cambio en el nivel de lactato

Las células cultivadas en el ejemplo 2-1 se cultivaron de nuevo en un medio que incluía glucosa 3 mM (baja) o 11 mM (normal). Las células cultivadas se interrumpieron por ultrasonificación. La concentración de lactato incluida en las células interrumpidas se midió usando un kit de ensayo de lactato (AbCam, Cambridge, MA) (figura 3). En este caso, las células cancerosas no tratadas con lactato de calcio se usaron como grupos control.

La figura 3 es un gráfico que muestra el resultado de comparar los niveles de lactato en células cancerosas dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio (CaLa). Como puede observarse en la figura 3, se confirmó que independientemente de la concentración de glucosa incluida en el medio, la concentración de lactato se incrementó en las células cancerosas tratadas con lactato de calcio lo cual fue más evidente en el caso de cultivar las células en un medio que tenía glucosa de alta concentración.

EJEMPLO 2-3

Cambio en el pH dentro y fuera de la célula cancerosa

A partir de los resultados mostrados en las figuras 2 y 3, se confirmó que en los casos de tratamiento de una célula cancerosa con lactato de calcio, el lactato de calcio fluye hacia la célula cancerosa. A continuación, se verificó si el pH dentro y fuera de la célula cancerosa cambia o no por el lactato de calcio.

Específicamente, con las células cultivadas en el ejemplo 2-1, se midió un pH extracelular con un medidor de pH del medio para las células tratadas con lactato de calcio y luego se cultivó y se midió un pH intracelular con un kit de detección de pH (Life Technologies, CA) de las células tratadas con lactato de calcio y luego se cultivaron (figura 4). En este caso, las células cancerosas no tratadas con lactato de calcio se usaron como grupos control.

La figura 4 proporciona gráficos que muestran los cambios en el pH intracelular y extracelular de las células cancerosas tratadas con lactato de calcio y el gráfico de la izquierda muestra el cambio en el pH extracelular de las células cancerosas y el gráfico derecho muestra el cambio en el pH intracelular de las células cancerosas. Como puede observarse en la figura 4, se confirmó que en el caso de tratar las células con lactato de calcio, el pH extracelular no cambió, pero el pH intracelular disminuyó a condición ácida. Como puede verse en el gráfico de la izquierda de la figura 4, el propio lactato de calcio no cambió el pH fuera de la célula

cancerosa, pero cuando el lactato de calcio fluyó hacia la célula cancerosa, el pH disminuyó y, por lo tanto, el ambiente intracelular de la célula cancerosa fue cambiado por la entrada de lactato de calcio.

EJEMPLO 3

Efecto del lactato de calcio en la expresión del factor de crecimiento del cáncer

A partir del resultado del ejemplo 2, se confirmó que el entorno intracelular de una célula cancerosa se puede cambiar por lactato de calcio. Por lo tanto, con el fin de comprobar si tal cambio provoca un cambio en el crecimiento de una célula cancerosa, los niveles de expresión de β -catenina, que es uno de los factores de crecimiento de cáncer, se comprobaron a nivel de expresión de genes y proteínas, dependiendo del tratamiento con lactato de calcio, en una línea celular de cáncer colorrectal o de cáncer de mama.

EJEMPLO 3-1

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de β -catenina en la línea celular de cáncer colorrectal

Se cultivaron líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) por el mismo método que el del ejemplo 2-1, excepto que se trataron con lactato de calcio 0 mM, 1.5 mM o 2.5 mM, y se obtuvieron las células de cáncer cultivadas. A continuación, se compararon los niveles de expresión de β -catenina, dependiendo de la concentración de lactato de calcio, a los niveles de expresión de ARNm y proteína incluidos en el mismo.

En primer lugar, con el fin de comparar los niveles de expresión de ARNm, se extrajo el ARN total de cada una de las células de cáncer usando un mini kit RNeasy y se sintetizó ADNc utilizando una transcriptasa inversa. El gen de β -catenina se obtuvo mediante PCR de transcriptasa inversa usando el ADNc sintetizado como molde y los cebadores descritos a continuación.

β -catenina F: 5'-AAAATGGCAGTGCGTTTAG-3' (SEQ ID NO:1)

β -catenina R: 5'-TTTGAAGGCAGTCTGTCTCGTA-3' (SEQ ID NO:2)

ACTINA F: 5'-AAC-TGGAACGGTGAAGGT-3' (SEQ ID NO:3)

ACTINA R: 5'-CCTGTAACAACGCATCTCAT-3' (SEQ ID NO:4)

La parte superior de la figura 5 proporciona imágenes electroforéticas que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de ARNm de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-

1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones y la parte inferior de la figura 5 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteínas de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Como puede verse desde la parte superior de la figura 5, No hubo diferencias en los niveles de expresión de ARNm de β -catenina, dependiendo de la concentración de lactato de calcio.

A continuación, con el fin de comparar los niveles de expresión de proteínas, cada una de las células cancerosas se interrumpió y se realizó electroforesis. A continuación, se realizó una transferencia de Western utilizando anticuerpo anti β -catenina como anticuerpo primario y un conjugado de IgG anti-conejo como anticuerpo secundario (parte inferior de la figura 5) y las manchas se analizaron con el programa Image-J. En este caso, la actina se utilizó como grupos de control interno.

La parte superior de la figura 5 proporciona imágenes electroforéticas que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de ARNm de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones y la parte inferior de la figura 5 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteínas de β -catenina en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Como puede verse desde la parte inferior de la figura 5, Se confirmó que a medida que aumenta la concentración de lactato de calcio, los niveles de expresión de la proteína β -catenina se reducen a diferencia de los niveles de expresión de ARNm de β -catenina.

Por lo tanto, se confirmó que el lactato de calcio que fluye en una célula cancerosa cambia el entorno intracelular de la célula cancerosa y por lo tanto la expresión de β -catenina, que es un factor de crecimiento del cáncer, se suprime en el nivel de decodificación de genes.

EJEMPLO 3-2

Efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión de β -catenina en la línea celular de cáncer de mama

Usando el mismo método que el del ejemplo 3-1 se compararon los niveles de expresión de β -catenina y β -catenina activada dependiendo de la concentración de lactato de calcio en el nivel de expresión de proteína (figura 6) con

una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) cultivada en un medio de cultivo de células de cáncer (medio RPMI1640 que incluye FBS al 10% y penicilina al 1%/estreptomicina) a 37°C con 5% de CO₂ y una línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) cultivadas en otro medio de cultivo de células de cáncer (medio DMEM que incluye FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%) a 37°C con 5% de CO₂.

La figura 6 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de la catenina total β y la catenina activada β en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Como puede observarse en la figura 6, Se confirmó que a medida que aumenta la concentración de lactato de calcio, disminuyen los niveles de expresión de proteínas tanto de la β -catenina como de la β -catenina activada.

EJEMPLO 4

Efecto del lactato de calcio en la energía del cáncer

A través del ejemplo 2, se confirmó que cuando se trata una línea celular de cáncer con lactato de calcio, se aumenta la concentración de lactato de calcio en la línea celular de cáncer. A continuación, se comprobó si el aumento de lactato modifica la síntesis de lactato.

Se cultivaron líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Las líneas celulares cultivadas bajo la condición de hipoxia se trataron con lactato de calcio y, a continuación, se compararon los niveles de expresión de GLUT1 y HK2 en cada una de las líneas celulares cultivadas en los niveles de expresión de ARNm y proteína (figura 7).

La figura 7 es una PCR en tiempo real y una transferencia Western que muestra el efecto del lactato de calcio en la línea celular de cáncer bajo condiciones hipóxicas. La gráfica muestra los niveles de expresión de ARNm del transportador de glucosa (GLUT)-1 y hexoquinasa (HK)2, que se implicaron en la etapa temprana de la glicolisis y las imágenes de transferencia de Western que muestran los niveles de expresión de proteína de HK2. Como puede observarse en la figura 7, se confirmó que bajo la condición de hipoxia, los niveles de expresión de GLUT1 y HK2 que actúan en la etapa temprana de la glucólisis están aumentados y como resultado la glicolisis se activa pero tratando las líneas celulares con lactato de calcio la activación se reduce.

EJEMPLO 5

Análisis de la estabilización del gen del cáncer causado por el lactato de calcio

Se verificó si el tratamiento con lactato de calcio produce o no un cambio en los niveles de expresión de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad del ADN como parte de una ruta de escisión base reparando genes dañados.

EJEMPLO 5-1

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de PARP en la línea celular de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231) se cultivaron por el mismo método que el del ejemplo 2-1 excepto que se trataron con lactato de calcio 0 mM, 2.5 mM o 5.0 mM y las células cancerosas cultivadas se obtuvieron. A continuación, se analizaron los cambios en el nivel de expresión dependiendo de la concentración de lactato de calcio a los niveles de expresión proteica de PARP incluidos en la misma (figura 8). En este caso, el cambio en el nivel de expresión se analizó mediante un Western blot utilizando el programa Image-J con anticuerpo anti-PARP como anticuerpo primario y conjugado de IgG anti-conejo como anticuerpo secundario, y se usó GAPDH como grupos de control interno.

La figura 8 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los efectos del lactato de calcio en los niveles de expresión de proteína de PARP y PARP escindido expresado en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231). Como puede observarse en la figura 8, se confirmó que a medida que aumenta la concentración de lactato de calcio, disminuyen los niveles de expresión de proteína de PARP en cada una de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). Mientras tanto, los niveles de expresión proteica de la PARP troncada aumentan en la línea celular MCF-7. Por lo tanto, se confirmó que el lactato de calcio no sólo detiene la glucólisis en una célula cancerosa, sino que también induce la apoptosis de una célula cancerosa interrumpiendo la glucólisis y por lo tanto puede usarse como un fármaco contra el cáncer.

EJEMPLO 5-2

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de PARP en la línea celular de cáncer colorrectal

Los niveles de expresión proteica de PARP expresados en la línea celular de cáncer colorrectal se compararon (figura 9) después de tratar una línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT-116) individualmente o en combinación durante 24 horas con lactato de calcio 5 mM, 5-indanosulfonamida (IS) como un inhibidor de la anhidrasa carbónica o ácido cinámico (CA) como un inhibidor de MCT-4 que es una vía de lactato. En este caso, se utilizó una línea celular de cáncer sin tratar como un grupo de control.

La figura 9 proporciona una imagen de transferencia Western y un gráfico que muestra el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de PARP en líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con lactato de calcio, sulfonamida de indano (IS) como inhibidor de anhidrasa carbónica o ácido cinámico (CA) como un inhibidor de MCT-4, que es una vía de salida de lactato, individualmente o en combinación. Como puede observarse en la figura 9, se confirmó que en el caso del tratamiento con cada uno de los materiales descritos anteriormente solo, los niveles de expresión proteica de PARP disminuyen, sólo cuando la línea celular de cáncer colorrectal humano se trata con lactato de calcio solo. Sin embargo, se confirmó que cuando la línea celular de cáncer colorrectal humano se trata con combinación de dos inhibidores mientras no se trata con lactato de calcio, los niveles de expresión de proteína de PARP disminuyen y cuando la línea celular de cáncer colorrectal se trata en combinación con cada inhibidor y lactato de calcio, los niveles de expresión de proteína de PARP se redujeron adicionalmente, y cuando la línea celular de cáncer colorrectal humano se trata en combinación con los tres materiales, la PARP no se detecta en una célula.

EJEMPLO 5-3

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de PARP en la línea celular de melanoma

Cada una de las líneas celulares de melanoma humano (SKMEL-02 y SKMEL-28) cultivadas en un medio de cultivo de células de cáncer (medio RPMI1640 incluyendo FBS al 10% y penicilina al 1%/estreptomicina) a 37°C con 5% de CO₂ se trató con lactato de calcio 0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM o 10 mM durante 12 horas. A continuación, se compararon los niveles de expresión proteica de PARP expresados en las líneas celulares de melanoma (figura 10).

La figura 10 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran el resultado de comparar los niveles de expresión de proteína de PARP en líneas celulares de melanoma humano (SKMEL-02 y SKMEL-28) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Como puede observarse en la figura 10, se confirmó que los niveles de expresión proteica de PARP en las líneas celulares de melanoma también disminuyen a medida que aumenta la concentración de lactato de calcio.

EJEMPLO 6

Efecto del lactato de calcio sobre el metabolismo relacionado con el lactato en células cancerosas

A partir de los resultados mostrados en las figuras 2 y 4, se confirmó que cuando el lactato de calcio fluye en una célula cancerosa, la concentración de lactato en la célula aumenta y, por lo tanto, el suministro de energía a través de la glucólisis puede no ser realizado normalmente.

A continuación, se examinó un efecto del lactato sobre el metabolismo intracelular causado por el tratamiento con lactato de calcio.

EJEMPLO 6-1

Efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión de la proteína LDH-B (lactato deshidrogenasa B)

Se examinó el efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de la proteína LDH-B (lactato deshidrogenasa B), que es una enzima para convertir lactato en piruvato.

Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) se trataron con lactato de calcio 2.5 mM y se cultivaron durante 24 horas. Las líneas celulares de cáncer cultivadas se inmovilizaron con paraformaldehído al 4% y se trataron con un anticuerpo LDHB de anti-conejo durante 15 horas. A continuación, las líneas celulares de cáncer se lavaron con PBS y se trataron con un anticuerpo secundario conjugado con biotina y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, las líneas celulares de cáncer se trataron con estreptavidina conjugada con FITC para realizar la tinción con fluorescencia y después se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (figuras 11a a 11c). En este caso, las líneas celulares de cáncer cultivadas bajo condiciones de normoxia (N-control) o condición de hipoxia (control H) se usaron como grupos control, y un núcleo de cada célula se tiñó usando DAPI. Además, las fotos se analizaron

utilizando la serie Xenogen In Vivo Imaging System 100 y el software de imágenes vivas (Xenogen).

La figura 11a proporciona imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran los cambios en los niveles de expresión de proteína de LDH-B en líneas celulares de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 11b proporciona imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la absorbancia de fluorescencia de la línea celular de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 11c proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los niveles de desarrollo de fluorescencia dependiendo de los niveles de expresión de la proteína de LDH-B. Como puede verse en las figuras 11a a 11c, se confirmó que los niveles de expresión de la proteína de LDH-B en las células tratadas con lactato de calcio aumentaron bruscamente.

EJEMPLO 6-2

Efecto del lactato de calcio en el nivel de piruvato

A partir del resultado del ejemplo 6-1, se confirmó que los niveles de expresión de proteína de LDH-B en una célula cancerosa se incrementan tratando con lactato de calcio. A continuación, se examinó el efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión intracelular de piruvato producido por la LDH-B.

Cada una de las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) con el número de células de 5×10^5 células se trató con lactato de calcio 2.5 mM durante 24 horas y las células se interrumpieron por ultrasonificación y se filtraron usando un filtro de 10 kDa, para obtener el filtrado. El filtrado obtenido se aplicó a un kit de ensayo de piruvato (Abcam, Cambridge, MA) para medir la concentración de piruvato incluido en el filtrado (figura 12).

La figura 12 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de piruvato en las células cancerosas dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 12, se confirmó que los niveles de piruvato en las células tratadas con lactato de calcio aumentaron bruscamente.

EJEMPLO 6-3

Efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión de PDH (piruvato deshidrogenasa)

A partir del resultado del ejemplo 6-2, se confirmó que un nivel de piruvato en una célula cancerosa se incrementa tratando con lactato de calcio. A

continuación, se examinó un efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de PDH (piruvato deshidrogenasa), que es una enzima para convertir el piruvato en un ciclo de TCA.

Después del mismo método que el del ejemplo 6-1, excepto que se utilizó un anticuerpo PDH de anti-conejo en lugar del anticuerpo LDHB de anti-conejo, los niveles de expresión de proteína de PDH en las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) tratados con lactato de calcio se midieron (figura 13).

La figura 13a proporciona imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran cambios en los niveles de expresión de PDH en las líneas celulares de cáncer dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. La figura 13b proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los niveles de desarrollo de fluorescencia de PDH dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. Como puede observarse en las figuras 13a y 13b, se confirmó que los niveles de expresión proteica de PDH en las células tratadas con lactato de calcio aumentan bruscamente.

EJEMPLO 6-4

Efecto de lactato de calcio en el nivel de α -KG (α -cetoglutarato)

A partir del resultado del ejemplo 6-3, se confirmó que los niveles de expresión de proteína de PDH en una célula cancerosa se incrementan tratando con lactato de calcio. A continuación, se examinó el efecto del lactato de calcio sobre los niveles intracelulares de α -KG (α -cetoglutarato) producido por el ciclo de TCA activado por PDH. El α -KG se puede sintetizar por glutamina en un medio. Así, en este caso, se usaron líneas celulares de cáncer cultivadas en un medio normal o un medio libre de glutamina.

Las líneas celulares de cáncer con el número de células de 5×10^5 células cultivadas en un medio normal o un medio libre de glutamina se trataron con lactato de calcio 2.5 mM durante 24 horas y las células se interrumpieron por ultrasonificación y se filtraron usando un filtro de 10 kDa para obtener el filtrado. El filtrado obtenido se aplicó a un kit de ensayo de α -cetoglutarato (BioVision, Exton, PA) para medir la concentración de α -KG incluida en el filtrado (figuras 14a y 14b).

La figura 14a proporciona una gráfica de análisis cuantitativo que muestran los cambios en la concentración de α KG en las líneas celulares de cáncer con el tratamiento de lactato de calcio en condiciones normales. La figura 14b proporciona un gráfico de análisis cuantitativo que muestra los cambios en la

concentración de α KG en líneas celulares de cáncer con tratamiento con lactato de calcio bajo un medio libre de glutamina. Como puede observarse en las figuras 14a y 14b, se confirmó que si las líneas celulares de cáncer cultivadas en el medio normal o en el medio libre de glutamina se tratan con lactato de calcio, los niveles de α -KG en las células aumentan bruscamente.

Sumando los resultados de los ejemplos 6-1 a 6-4, puede verse que en una célula cancerosa tratada con lactato de calcio, los niveles de LDH-B para convertir lactato en piruvato, piruvato producido por LDH-B, PDH (piruvato deshidrogenasa) para convertir el piruvato en un ciclo de TCA, y α -KG producido por el ciclo de TCA activado por la PDH se incrementan.

EJEMPLO 7

Efecto del lactato de calcio sobre la metástasis, la invasión y los niveles de expresión del factor de angiogénesis

A partir del resultado del ejemplo 6, se confirmó que en una célula cancerosa tratada con lactato de calcio, se aumentan los niveles de α -KG. A continuación, se examinaron los efectos del lactato de calcio en los niveles de expresión de factores que afectan a la metástasis, invasión y angiogénesis de una célula cancerosa de la que se regulan los niveles de expresión de una proteína por la α -KG.

EJEMPLO 7-1

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de proteína de HIF-1 α (factor inducible de hipoxia 1 α)

Se examinó el efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión de la proteína de HIF-1 α (factor inducible de hipoxia 1 α) conocido como un factor de metástasis de células de cáncer.

Se cultivaron líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) durante 24 horas, bajo condiciones de normoxia o hipoxia tratadas o no tratadas con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se realizó una transferencia Western usando un anticuerpo anti-HIF-1 α a cada una de las líneas celulares de cáncer cultivadas (parte superior de la figura 15).

La parte superior de la figura 15 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los niveles de expresión proteica de HIF-1 α expresadas en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT29) cultivadas durante

24 horas con o sin el tratamiento con lactato de calcio 2.5 mM bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Como puede verse desde la parte superior de la figura 15, se confirmó que HIF-1 α se expresa bajo condición de hipoxia, pero si las líneas celulares de cáncer se tratan con lactato de calcio, HIF-1 α no se expresa incluso en condiciones de hipoxia.

A continuación, se trataron las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) con diversas concentraciones (0.5 mM, 1.5 mM y 2.5 mM) del lactato de calcio bajo condiciones de hipoxia y se cultivaron y se modificaron los niveles de expresión de HIF-1 α en un núcleo de una célula cancerosa (parte inferior de la figura 15).

La parte inferior de la figura 15 proporciona imágenes de transferencia Western que muestran los niveles de expresión proteica de HIF-1 α expresadas en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con el tratamiento de lactato de calcio 0.5 mM, 1.5 mM y 2.5 mM bajo condiciones de hipoxia. Como puede verse desde la parte inferior de la figura 15, se confirmó que el lactato de calcio suprime los niveles de expresión de la concentración de HIF-1 α dependientemente.

EJEMPLO 7-2

Efecto del lactato de calcio en los niveles de expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)

A partir del resultado del ejemplo 7-1, se confirmó que el lactato de calcio suprime los niveles de expresión de la concentración de HIF-1 α dependientemente. A continuación, se examinó el efecto del lactato de calcio sobre los niveles de expresión de un VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) conocido como un factor de invasión de células cancerosas cuya expresión está regulada por el HIF-1 α .

Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) se trataron con lactato de calcio 2.5 mM bajo condiciones de hipoxia y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, se analizaron los niveles de expresión de ARNm y los niveles de expresión de proteína de VEGF en cada una de las líneas celulares de cáncer cultivadas (figuras 16a y 16b). En este caso, las líneas celulares de cáncer colorrectal humano cultivadas sin tratamiento con lactato de calcio bajo condiciones de normoxia o hipoxia se usaron como grupos control.

La figura 16a proporciona gráficos que muestran el resultado de la medición de los niveles de expresión de ARNm y los niveles de expresión de una

proteína (figura 16b) de VEGF expresado en líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116 y HT-29) cultivadas durante 24 horas con o sin el tratamiento con lactato de calcio 2.5 mM bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Como puede observarse en las figuras 16a y 16b, se confirmó que el nivel de VEGF aumenta bruscamente en condiciones de hipoxia, pero si las líneas celulares de cáncer se tratan con lactato de calcio, el nivel aumentado de VEGF disminuye.

EJEMPLO 7-3

Efecto del lactato de calcio sobre el factor derivado de células cancerosas que causa la formación de tubos de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC)

Con el fin de confirmar el efecto del lactato de calcio sobre la angiogénesis, se examinó el efecto del lactato de calcio sobre el factor secretado de una célula cancerosa que puede inducir la formación de tubo de una célula endotelial vascular humana (HUVEC).

Las líneas celulares de cáncer cultivadas en medio RPMI-1640 añadido con FBS al 1% se trataron con lactato de calcio 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM y 2.5 mM durante 24 horas y se obtuvieron sobrenadantes de cultivo. Se inoculó una célula endotelial vascular humana (HUVEC) en cada uno de los sobrenadantes de cultivo obtenidos y se cultivaron para analizar un cambio conformacional de células (figura 17). En este caso, se utilizó una HUVEC cultivada utilizando el medio de cultivo de una línea celular cancerosa cultivada sin tratamiento con lactato de calcio como un grupo control, y se utilizó una HUVEC cultivada con el tratamiento con sulforafano, que es un inhibidor del crecimiento de una HUVEC como grupo de comparación.

La figura 17 son imágenes de fluorescencia que muestran los niveles de formación de tubos en células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) tratadas con lactato de calcio a diversas concentraciones. Las HUVEC se cultivaron usando el medio de líneas celulares de cáncer cultivadas con diferentes concentraciones de lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 17, se confirmó que en comparación con el grupo de control mostrando una excelente capacidad de formación de tubos, las HUVEC cultivadas usando los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares de cáncer tratadas con lactato de calcio mostraron una capacidad de formación de tubos reducida a medida que aumenta la concentración de lactato de calcio, y las HUVEC cultivadas en el sobrenadante de cultivo de la línea celular cancerosa tratada con lactato de calcio 2.5 mM mostró una capacidad de formación de tubos reducida similar al grupo de comparación tratado con sulforafano. Se confirmó que dado que la angiogénesis de las HUVEC es

inducida por un factor secretado de una célula cancerosa, el lactato de calcio tiene actividad inhibidora dependiente de la concentración del factor que induce la angiogénesis.

Sumando los resultados de los ejemplos 7-1 a 7-3, puede verse que el lactato de calcio tiene un efecto de inhibición de la expresión de HIF-1 α conocido como un factor de metástasis de células cancerígenas y VEGF conocido como factor de invasión de células de cáncer y también tiene un efecto que reduce la angiogénesis.

EJEMPLO 8

Efecto del lactato de calcio en la metástasis y la invasión de la línea celular cancerosa

A partir del resultado del ejemplo 7, se confirmó que el lactato de calcio tiene un efecto inhibidor de la expresión de HIF-1 α conocido como un factor de metástasis de células cancerígenas y VEGF conocido como un factor de invasión de células de cáncer y también tiene un efecto de inhibición de la actividad de un factor que induce la angiogénesis. A continuación, se examinaron los efectos reales del lactato de calcio sobre la metástasis y la invasión de una célula cancerosa analizando la migración de la célula cancerosa.

EJEMPLO 8-1

Efecto del lactato de calcio sobre la metástasis y la invasión de la línea celular de cáncer colorrectal

Se inoculó una línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 con el número de células de 4×10^5 células en un recipiente de cultivo en cuyo centro se colocó un inserto de cultivo ibidi que tenía un espesor de 500 μm se trató con lactato de calcio 2.5 mM y después se cultivó durante 24 horas. A continuación, se retiró el inserto y se cultivó adicionalmente durante 12 horas para analizar la migración de las células cancerosas a un sitio en donde se retiró el inserto usando un JuLi Br, analizador de células vivas (NanoEnTek Inc., Corea del Sur) (figura 18). En este caso, se usó una línea celular de cáncer colorrectal cultivada sin tratamiento con lactato de calcio como grupo de control.

La figura 18 proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer colorrectal, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio.

Como puede observarse en la figura 18, se confirmó que en la línea celular de cáncer colorrectal tratada con lactato de calcio, la migración celular es disminuida, mientras que en la línea celular de cáncer colorrectal del grupo control no tratado con lactato de calcio, se mantiene la migración celular.

EJEMPLO 8-2

Efecto del lactato de calcio sobre la metástasis y la invasión de la línea celular de cáncer de mama

Utilizando el mismo método que en el ejemplo 8-1, con líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB231) en lugar de la línea celular de cáncer colorrectal, se examinó un efecto del lactato de calcio sobre la migración de las líneas celulares de cáncer de mama (figura 19).

La figura 19 proporciona fotos que muestran el resultado de confirmar la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer de mama, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 19, se confirmó que en comparación con las líneas celulares de cáncer de mama de los grupos control no tratados con lactato de calcio, las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con lactato de calcio muestran niveles relativamente bajos de metástasis.

EJEMPLO 8-3

Efecto del lactato de calcio sobre la metástasis y la invasión de la línea celular de melanoma

Usando el mismo método que en el ejemplo 8-1, con líneas celulares de melanoma (SKMEL-02 y SKMEL-28) en lugar de la línea celular de cáncer colorrectal y cultivadas adicionalmente durante 24 horas después de retirar el inserto se realizó, el efecto del lactato de calcio en la migración de las líneas celulares de melanoma se examinó (figura 20).

La figura 20 proporciona fotos que muestran el resultado que confirma la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de melanoma, dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 20, se confirmó que en comparación con las líneas celulares de melanoma de los grupos control no tratados con lactato de calcio, las líneas celulares de melanoma tratadas con lactato de calcio muestran niveles relativamente bajos de metástasis.

Sumando los resultados de los ejemplos 8-1 a 8-3, puede verse que el

lactato de calcio puede inhibir la metástasis de todas las células cancerosas tales como el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y las células de melanoma.

EJEMPLO 9

Efecto del lactato de calcio en la viabilidad de la línea celular cancerosa

Se examinó el efecto del lactato de calcio sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama, líneas celulares de cáncer colorrectal y líneas celulares de melanoma.

EJEMPLO 9-1

Efecto del lactato de calcio sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB231) se cultivaron durante 24 horas con o sin tratamiento con lactato de calcio 2.5 mM. Cada una de las líneas celulares de cáncer de mama se trató con 5 µl de anexina V FITC y 5 µl de PI y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se realizó un análisis de citometría de flujo utilizando un FACS Calibur (BD Bioscience, EUA) para evaluar su tinción y medir así una tasa de apoptosis de células cancerígenas (figuras 21a a 21f).

Las figuras 21a y 21d proporcionan fotos que muestran el resultado de confirmar la migración celular, que muestra la capacidad metastásica de una línea celular de cáncer de mama dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio para la línea celular MCF-7 y la línea celular MDA-MB231, respectivamente. Las figuras 21b, 21c, 21e y 21f proporcionan el resultado de un análisis de citometría de flujo que muestra cambios en la tasa de supervivencia. Como puede observarse en las figuras 21b y 21c, se confirmó que la línea celular MCF-7 muestra una tasa de apoptosis celular de 9.63% antes de tratar con lactato de calcio pero muestra una tasa de apoptosis celular de 33.8% después de tratar con lactato de calcio y la línea celular MDA-MB231 (figuras 21e y 21f) muestra una tasa de apoptosis celular del 10.17% antes del tratamiento con lactato de calcio pero muestra una tasa de apoptosis celular de 13.05% después de tratar con lactato de calcio.

Por lo tanto, se puede ver que si las líneas celulares de cáncer de mama son tratadas con lactato de calcio, se incrementa la velocidad de apoptosis celular.

EJEMPLO 9-2

Efecto del lactato de calcio sobre el cambio conformacional de la línea de células madre del cáncer colorrectal

Se inoculó una línea de células madre de cáncer colorrectal humano en un medio de cultivo de células madre (medio que incluía 1% de penicilina/estreptomicina y 50 veces B27 e incluyendo un medio DMEM y un medio F12 mezclado a 1:1) y se cultivó a 37°C con 5% CO₂. La línea de células madre de cáncer colorrectal cultivado se trató con lactato de calcio y luego se comprobó si había o no el cambio conformacional de una esfera formada por las células madre (figura 22). En este caso, se usó una célula cancerosa tratada con DMSO en lugar de lactato de calcio como un grupo control.

La figura 22 proporciona imágenes microscópicas que muestran el cambio conformacional de una esfera dependiendo del tratamiento de una línea de células madre de cáncer colorrectal que constituye la esfera con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 22, se confirmó que en el grupo de control que no se trató con lactato de calcio se mantiene una esfera, pero después de tratar con lactato de calcio, se destruye la conformación de la esfera, confirmando así la reducción de la viabilidad de las células madre de cáncer colorrectal.

EJEMPLO 9-3

Efecto del lactato de calcio en la capacidad de formación de colonias de la línea celular cancerosa

En primer lugar, se inocularon líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) en medio sólido incluyendo varias concentraciones (0 mM, 0.5 mM, 1.5 mM, o 2.5 mM) de lactato de calcio y se cultivaron durante 10 días. Después de la terminación del cultivo, las células fueron inmovilizadas y teñidas con hematoxilina. A continuación, se contó el número de células cancerosas formadas en colonias (figura 23).

La figura 23 proporciona fotos y gráficos (izquierda: HCT-116, medio: HT-29, derecha: DLD-1) mostrando el resultado que compara la capacidad de formación de colonias de líneas celulares de cáncer colorrectal dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 23, se confirmó que todas las líneas celulares de cáncer colorrectal no tratadas con lactato de calcio forman de 260 a 360 colonias, pero el número de colonias disminuyó a medida que aumentó la concentración de lactato de calcio y en el caso de tratamiento de las líneas celulares de cáncer colorrectal con lactato de calcio 2.5

mM, sólo se forman de 100 a 120 colonias.

Después, utilizando el mismo método descrito anteriormente, se inocularon líneas celulares de melanoma humano (SKMEL02 y SKMEL-28) en medio sólido incluyendo varias concentraciones (1 mM, 2.5 mM, o 5 mM) de lactato de calcio y se realizó el cultivo, y se contó el número de células cancerosas formadas en colonias (figuras 24a y 24b).

Las figuras 24a y 24b proporciona gráficos y cuadros que muestran el resultado que compara la capacidad formadora de colonias de líneas celulares de melanoma dependiendo del tratamiento con lactato de calcio. Como puede observarse en las figuras 24a y 24b, se confirmó que las líneas celulares de melanoma humano no tratadas con lactato de calcio formaban 105 a 168 colonias, pero el número de colonias disminuyó a medida que aumentó la concentración de lactato de calcio y en el caso de tratar la línea celular SKMEL-28 con lactato de calcio 5 mM, no se formó la colonia y en el caso de tratar la línea celular SKMEL-02 con lactato de calcio 5 mM, se forman aproximadamente 49 colonias.

Resumiendo el resultado, se puede ver que el lactato de calcio tiene un efecto de inhibición de la capacidad de formación de colonias del cáncer colorrectal y las líneas celulares de melanoma.

EJEMPLO 9-4

Efecto de la combinación de lactato de calcio con material que tiene actividad anticancerígena sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer

Se prepararon placas basadas en agarosa semi-fármaco incluyendo lactato de calcio 5 mM o los materiales conocidos como teniendo actividad anticancerígena (1 mM IS (5-indano sulfonamida) o 5 mM CA (ácido cinámico)) individualmente o en combinación. A continuación, se inoculó una línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116 en cada una de las placas preparadas y se cultivó durante 10 días. A continuación, se compararon las tasas de supervivencia de las células (figuras 25a y 25bB).

Las figuras 25a y 25b proporcionan gráficos que muestran el resultado de comparar la tasa de supervivencia de líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas individualmente o en combinación con lactato de calcio, 5-indano sulfonamida (IS) como un inhibidor de anhidrasa carbónica o ácido cinámico (CA) como un inhibidor de MCT-4 que es una vía de salida de lactato. Como puede observarse en las figuras 25a y 25b, se confirmó que las tasas de supervivencia de la línea celular de cáncer colorrectal tratada con el lactato de calcio o los materiales conocidos como teniendo una actividad anticancerígena (IS o CA) individualmente se

redujeron hasta aproximadamente el 60% y las tasas de supervivencia de la línea celular de cáncer colorrectal tratada con el lactato de calcio en combinación con IS o CA o ambos se redujeron adicionalmente a aproximadamente 10% a 30%.

EJEMPLO 9-5

Efecto del lactato de calcio en la viabilidad de la línea celular cancerosa con disminución de la adhesividad celular

Se inocularon líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HCT-116, HT-29 y DLD-1) en una placa de 6 pozos con baja adhesividad y luego se trataron en cultivo con diversas concentraciones (0 mM, 1.5 mM o 2.5 mM) de lactato de calcio. A continuación, se compararon las tasas de supervivencia de las células (figura 26).

La figura 26 proporciona gráficos que muestran el resultado que compara los efectos del lactato de calcio sobre una tasa de supervivencia de líneas celulares de cáncer colorrectal cultivadas en un recipiente de cultivo con baja adhesividad. Como puede observarse en la figura 26, se confirmó que si las líneas celulares de cáncer colorrectal cultivadas en un medio de cultivo con baja adhesividad no se tratan con lactato de calcio, la tasa de apoptosis celular es muy baja (aproximadamente 5%), pero si se tratan con lactato de calcio, la tasa de apoptosis celular se incrementa bruscamente (alrededor del 90%).

Sumando los resultados de los ejemplos 9-1 a 9-5, puede verse que el lactato de calcio puede disminuir las tasas de supervivencia de todas las células cancerosas tales como el cáncer colorrectal y las células de melanoma.

EJEMPLO 10

Verificación del efecto del lactato de calcio utilizando el modelo animal

EJEMPLO 10-1

Configuración del grupo experimental utilizando el modelo animal

Una célula de cáncer colorrectal (HT-29) cultivada en un medio RPMI1640 y luego diluida con PBS fue implantada subcutáneamente en el flanco de ratones Balb/c. Los ratones fueron criados hasta que la célula de cáncer colorrectal creció hasta aproximadamente 5 mm. Luego, se establecieron cuatro grupos; un grupo control no tratado con lactato de calcio durante 30 días, un grupo experimental 1 (peroral, P.O.) administrado con lactato de calcio 2.5 mM por administración oral, un grupo experimental 2 (intra tumoral, I.T.) inyectado con lactato de calcio 2.5 mM alrededor del tumor y un grupo experimental 3 (subcutáneo, S.C.) inyectado

subcutáneamente con lactato de calcio 25 mM (figura 27).

La figura 27 es una ilustración esquemática del esquema experimental para el tratamiento con lactato de calcio usando modelos animales.

EJEMPLO 10-2

Cambio en los niveles de expresión de PARP

Se extrajeron los tejidos de cáncer colorrectal de los ratones del grupo control, el grupo experimental 1 o el grupo experimental 2 establecido en el ejemplo 10-1 y se compararon los niveles de expresión de PARP y PARP truncada que contribuían a la estabilización de las células cancerosas expresadas en el mismo (figura 28).

La figura 28 es una imagen que muestra el cambio en los niveles de expresión de las proteínas PARP extraídas del tejido tumoral del modelo de xenoinjerto animal dependiendo del método de tratamiento del lactato de calcio y si se trató o no con lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 28, se confirmó que en los grupos experimentales tratados con lactato de calcio de diferentes maneras en comparación con el grupo control no tratado con lactato de calcio, se incrementa la actividad de degradación de PARP.

EJEMPLO 10-3

Cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α y VEGF en un modelo animal administrado con lactato de calcio por administración oral

Los tejidos de cáncer colorrectal se extrajeron de los ratones del grupo control o del grupo experimental 1 configurado en el ejemplo 10-1, y se compararon los niveles de expresión de HIF-1 α y VEGF implicados en la metástasis, invasión y angiogénesis del tumor expresado en el mismo (figura 29). En este caso, GAPDH se utilizó como grupos de control interno.

La figura 29 proporciona fotos que muestran el cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α o GAPDH dependiendo de si se trataron o no con lactato de calcio, en proteínas extraídas de tejidos tumorales de los modelos animales en los que se administró por vía oral lactato de calcio. Como puede observarse en la figura 29, Se confirmó que la expresión del HIF-1 α y el VEGF se inhibe en el grupo experimental 1 tratado con lactato de calcio en comparación con el grupo control no tratado con lactato de calcio.

EJEMPLO 10-4

Cambio en el tamaño del tumor en el modelo animal administrado con lactato de calcio por administración oral

Los volúmenes de tejidos de cáncer colorrectal extraídos de los ratones del grupo de control o del grupo experimental 1 establecido en el ejemplo 10-1 se midieron en el tiempo y se compararon entre sí (figura 30).

La figura 30 es un gráfico que muestra el cambio en el volumen del tumor dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio en un modelo animal en donde se administró oralmente con lactato de calcio 2.5 mM. Como puede observarse en la figura 30, El volumen tumoral final del grupo de control no tratado con lactato de calcio es de aproximadamente $1200 \text{ mm}^3 \times 103$, mientras que el del grupo experimental 1 tratado con lactato de calcio es aproximadamente $480 \text{ mm}^3 \times 103$. Por lo tanto, puede verse que el lactato de calcio tiene un efecto de inhibición del crecimiento del tumor.

EJEMPLO 10-5

Cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α y VEGF en modelos animales inyectados con lactato de calcio

Los tejidos de cáncer colorrectal se extrajeron de los ratones del grupo control o del grupo experimental 2 configurado en el ejemplo 10-1, y se compararon los niveles de expresión de HIF-1 α y VEGF implicados en la metástasis, invasión y angiogénesis del tumor expresado en el mismo (figura 31). En este caso, GAPDH se utilizó como grupos de control interno.

La figura 31 proporciona transferencias de Western que muestran el cambio en los niveles de expresión de HIF-1 α o GAPDH en la proteína extraída de tejidos tumorales del modelo de xenoinjerto animal dependiendo de si se ha tratado o no con lactato de calcio alrededor del tumor. Como puede observarse en la figura 31, se confirmó que en el grupo experimental 2 tratado con lactato de calcio en comparación con el grupo control no tratado con lactato de calcio, se inhibió la expresión del HIF-1 α y el VEGF.

EJEMPLO 10-6

Cambio en el tamaño del tumor en un modelo animal inyectado con lactato de calcio

Los volúmenes de tejidos de cáncer colorrectal extraídos de los ratones del grupo de control o del grupo experimental 2 establecido en el ejemplo 10-1 se midieron en el tiempo y se compararon entre sí (figura 32).

La figura 32 proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen del tumor dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio 2.5 mM alrededor de un tumor. Como puede observarse en la figura 32, se confirmó que el volumen tumoral final del grupo control no tratado con lactato de calcio es de aproximadamente $1200 \text{ mm}^3 \times 10^3$, mientras que el del grupo experimental 2 tratado con lactato de calcio es aproximadamente $490 \text{ mm}^3 \times 10^3$. Por lo tanto, puede verse que el lactato de calcio tiene un efecto de inhibición del crecimiento del tumor.

EJEMPLO 10-7

Cambio en la morfología tumoral del modelo animal dependiendo del tratamiento con lactato de calcio

Las morfologías tumorales de los ratones del grupo de control o del grupo experimental 2 configurado en el ejemplo 10-1 se compararon entre sí (figura 33).

La figura 33 proporciona fotos que muestran el cambio en la morfología tumoral de un modelo animal dependiendo de la inyección de lactato de calcio 2.5 mM alrededor del tumor. Como puede observarse en la figura 33, se confirmó que el tumor fotografiado del grupo control no tratado con lactato de calcio tiene un tamaño grande con angiogénesis aumentada en su superficie, mientras que el tumor fotografiado del grupo experimental disminuye en tamaño con angiogénesis disminuida.

EJEMPLO 10-8

Cambio en el tamaño del tumor en el modelo animal inyectado subcutáneamente con lactato de calcio

Los volúmenes de tejidos de cáncer colorrectal extraídos de los ratones del grupo de control o del grupo experimental 3 establecido en el ejemplo 10-1 se

midieron en el tiempo y se compararon entre sí (figura 34).

La figura 34 es un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral dependiendo de si se trató o no con lactato de calcio en un modelo animal en el que se inyectó subcutáneamente lactato de calcio 25 mM alrededor de la nuca. Como puede observarse en la figura 34, se confirmó que el volumen tumoral final del grupo control no tratado con lactato de calcio es aproximadamente 2300 mm³, mientras que el del grupo experimental 3 tratado con lactato de calcio es de aproximadamente 80 mm³. Por lo tanto, se puede observar que el lactato de calcio 25 mM tiene un efecto de inhibición del crecimiento del tumor.

EJEMPLO 10-9

Cambio en la morfología tumoral del modelo animal dependiendo del tratamiento con lactato de calcio

Las morfologías tumorales de los ratones del grupo de control o del grupo experimental 3 configurado en el ejemplo 10-1 se compararon entre sí (figura 35).

La figura 35 proporciona fotos que muestran el cambio en la morfología del tumor en un modelo animal dependiendo del tratamiento con lactato de calcio 25 mM. Como puede observarse en la figura 35, se confirmó que el tumor fotografiado del grupo control no tratado con lactato de calcio 25 mM tiene un tamaño mayor con aumento de la angiogénesis en su superficie, mientras que el tumor fotografiado del grupo experimental 3 disminuye considerablemente de tamaño y la angiogénesis también se reduce. Por lo tanto, sumando los resultados de los ejemplos 10-1 a 10-9, el lactato de calcio con una concentración de 2.5 mM a 25 mM mostró una excelente actividad anticancerígena en un modelo animal.

EJEMPLO 11

Efecto del tratamiento del cáncer colorrectal por radiación en combinación con la administración de lactato de calcio

En los ejemplos 10-2, 10-3 y 10-5, se confirmó que la expresión de PARP, HIF-1 α y VEGF se disminuye tratando con lactato de calcio. En este caso, estos factores dan una resistencia a la radiación. Por lo tanto, si los factores disminuyen debido al lactato de calcio, la eficiencia de la radiación puede aumentar, lo que se verificó.

EJEMPLO 11-1

Determinación de grupos experimentales utilizando modelos animales

Una célula de cáncer colorrectal (HT-29 o HCT-116) se implantó subcutáneamente en el flanco de ratones. Los ratones fueron criados hasta que la célula de cáncer colorrectal creció hasta aproximadamente 5 mm. Luego, se establecieron cuatro grupos; un grupo control no tratado con lactato de calcio durante 30 días, un grupo experimental 11 (intra tumoral, I.T.) inyectado con lactato de calcio 2.5 mM, un grupo experimental 12 (IR) irradiado con radiación de 2 Gy cinco veces utilizando un irradiador de rayos X X-RAD 320 (300 kVp) equipado con un filtro de aluminio de 2.0 mm y un grupo experimental 13 (CaLa+IR) irradiado con radiación de 2 Gy cinco veces e inyectado al mismo tiempo lactato de calcio 2.5 mM (figura 36).

La figura 36 es una ilustración esquemática de un esquema experimental para el tratamiento con radiación y lactato de calcio usando modelos animales.

EJEMPLO 11-2

Cambio en el tamaño del tumor en modelo animal tratado con radiación en combinación con lactato de calcio

Los volúmenes de tejidos de cáncer colorrectal extraídos de los ratones del grupo de control o cada uno de los grupos experimentales establecidos en el ejemplo 11-1 se midieron con el tiempo y se compararon entre sí (figuras 37a y 37b).

La figura 37a proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de cáncer animal, que se preparó implantando la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 en el flanco dependiendo de si se trató con radiación y lactato de calcio individualmente o en combinación, y la figura 37b proporciona un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de cáncer animal, que se preparó implantando una línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 en el flanco dependiendo de si se trató con radiación y lactato de calcio individualmente o en combinación.

Como puede observarse en las figuras 37a y 37b, se confirmó que en los grupos experimentales tratados con radiación y lactato de calcio individualmente o en combinación en comparación con el grupo control no tratado con radiación y lactato de calcio, el crecimiento del tumor se inhibe independientemente del tipo de línea celular de cáncer colorrectal implantado y particularmente en el grupo

experimental 13 tratado con radiación en combinación con lactato de calcio, el crecimiento del tumor se inhibe al nivel más bajo.

Este resultado verificó que el tratamiento con lactato de calcio puede inhibir la expresión de factores que dan resistencia a la radiación y se analizó que en el caso del tratamiento con lactato de calcio en combinación con radiación se puede mejorar la eficacia del tratamiento anticancerígeno incluso con una dosis menor de radiación. Por lo tanto, el lactato de calcio puede usarse solo para tratar el cáncer. Sin embargo, se puede observar que si se administra lactato de calcio en combinación con irradiación de radiación, se puede obtener un efecto potenciado del tratamiento anticanceroso.

EJEMPLO 12

Tratamiento con fármacos anticancerosos bien conocidos en combinación con lactato de calcio

A través del ejemplo 9-4, se confirmó que el tratamiento con lactato de calcio en combinación con un material que muestra una actividad anticancerígena disminuye la viabilidad de una célula cancerosa en comparación con el tratamiento con lactato de calcio o el material solo. Sobre la base del resultado, se verificó un efecto de tratamiento de un fármaco anticanceroso bien conocido en combinación con lactato de calcio en diversas líneas celulares de cáncer.

EJEMPLO 12-1

Tratamiento con Imatinib en combinación con lactato de calcio

Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HT-29 y HCT-116) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M Imatinib solo o tratado con varias concentraciones (1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Imatinib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HT-29 y HCT-116) no tratadas con cualquier fármaco se usaron como grupos control (figuras 38a, 38b, 39a y 39b)

La figura 38a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en

combinación. La figura 38b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29) con lactato de calcio 2.5 mM y 1F, Imatinib 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación.

La figura 39a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-116) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. La figura 39b muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-116) con lactato de calcio 2.5 mM e Imatinib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 38a, 38b, 39a y 39b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprime en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Imatinib solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Imatinib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Imatinib solo.

EJEMPLO 12-2

Tratamiento con 5-FU(5-fluorouracilo) en combinación con lactato de calcio

Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HT-29 y HCT-116) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o 5-FU 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M solo o tratado con diversas concentraciones (2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M) de 5-FU en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HT-29 y HCT-116) no tratadas con cualquier fármaco se usaron como grupos control (figuras 40a, 40b, 41a y 41b).

La figura 40a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. La figura 40b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de la colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μ M, 5 μ M, y 1 μ M, solo o en combinación. La figura 41a muestra el resultado de comparar la

disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT-116) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. La figura 41b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT-116) con lactato de calcio 2.5 mM y 5-FU 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 40a, 40b, 41a y 41b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M) de 5-FU solo en comparación con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente, en los grupos tratados con 5-FU y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con 5-FU solo.

EJEMPLO 12-3

Tratamiento con Paclitaxel en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) y una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM y 2.5 nM solo o se trataron con diversas concentraciones (0.63 nM, 1.3 nM y 2.5 nM) de Paclitaxel en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usaron una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) y una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con cualquier fármaco como grupos de control (figuras 42a, 42b, 43a y 43b).

La figura 42a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 2.5 nM, 0.63 nM, 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 42b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 42a y 42b, se confirmó que en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con concentraciones bajas (0.63 nM, 1.3 nM y 2.5 nM) de Paclitaxel solo en comparación con el grupo de control, la capacidad de formación de colonias de las células

cancerosas se suprimen, y en los grupos tratados con Paclitaxel y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Paclitaxel solo, la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente.

La figura 43a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 43b muestra el resultado de la comparación de la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Paclitaxel 0.63 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 43a y 43b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con concentraciones bajas (0.63 nM, 1.3 nM y 2.5 nM) de Paclitaxel solo en comparación con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente, en los grupos tratados con Paclitaxel y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Paclitaxel solo.

EJEMPLO 12-4

Tratamiento con Gefitinib en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembró en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o 1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M Gefitinib solo o tratado con varias concentraciones (1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Gefitinib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 44a y 44b).

La figura 44a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Gefitinib 1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. La figura 44b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Gefitinib 1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 44a y 44b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se

suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (1.3 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Gefitinib solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Gefitinib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Gefitinib solo.

EJEMPLO 12-5

Tratamiento con Sorafenib en combinación con lactato de calcio

Se sembraron una línea celular de cáncer de hígado humano (Hep3B) con el número de células de 1×10^3 células en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Sorafenib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M solo o tratado con varias concentraciones (1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Sorafenib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de hígado humano (Hep3B) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 45a y 45b).

La figura 45a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep3B) con lactato de calcio 2.5 mM y Sorafenib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. La figura 45b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep3B) con lactato de calcio 2.5 mM y Sorafenib 1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 45a y 45b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (1 μ M, 2.5 μ M, y 5 μ M) de Sorafenib solo en comparación con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente, los grupos tratados con Sorafenib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Sorafenib solo.

EJEMPLO 12-6

Tratamiento con Irinotecan en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de

las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Irinotecan 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M solo o tratado con varias concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Irinotecan en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 46a y 46b).

La figura 46a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Irinotecan 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 46b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM e Irinotecan 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 46a y 46b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Irinotecan solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Irinotecan y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Irinotecan solo.

EJEMPLO 12-7

Tratamiento con Erlotinib en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembró en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Erlotinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M solo o tratado con varias concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Erlotinib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 47a y 47b).

La figura 47a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Erlotinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 47b muestra el resultado de comparar la supresión de la

formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Erlotinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 47a y 47b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Erlotinib solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente, en los grupos tratados con Erlotinib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Erlotinib solo.

EJEMPLO 12-8

Tratamiento con Sunitinib en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Sunitinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M solo o tratado con varias concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Sunitinib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 48a y 48b).

La figura 48a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Sunitinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. La figura 48b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29) con lactato de calcio 2.5 mM y Sunitinib 0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 48a y 48b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (0.5 μ M, 1 μ M, y 2 μ M) de Sunitinib solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Sunitinib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Sunitinib solo.

EJEMPLO 12-9**Tratamiento con Metotrexato en combinación con lactato de calcio**

La línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembró en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Metotrexato 5 nM, 10 nM y 20 nM solo o tratados con diversas concentraciones (5 nM, 10 nM y 20 nM) de Metotrexato en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 49a y 49b).

La figura 49a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y metotrexato 5 nM, 10 nM y 20 nM, solo o en combinación. La figura 49b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y metotrexato 5 nM, 10 nM y 20 nM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 49a y 49b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (5 nM, 10 nM y 20 nM) de Metotrexato solo como comparación con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente, en los grupos tratados con Metotrexato y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con metotrexato solo.

EJEMPLO 12-10**Tratamiento con Carboplatino en combinación con lactato de calcio**

La línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembró en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Carboplatino 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M solo o tratado con varias concentraciones (2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M) de Carboplatino en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con

cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 50a y 50b).

La figura 50a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Carboplatino 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. La figura 50b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Carboplatino 2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 50a y 50b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (2.5 μ M, 5 μ M, y 10 μ M) de Carboplatino solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con carboplatino y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con carboplatino solo.

EJEMPLO 12-11

Tratamiento con Docetaxel en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con el número de células de 1×10^3 células se sembró en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Docetaxel 0.6 nM, 1.3 nM y 2.5 nM solo o tratados con diversas concentraciones (0.6 nM, 1.3 nM y 2.5 nM) de Docetaxel en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 51a y 51b).

La figura 51a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Docetaxel 0.6 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. La figura 51b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) con lactato de calcio 2.5 mM y Docetaxel 0.6 nM, 1.3 nM, y 2.5 nM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 51a y 51b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con concentraciones bajas (0.6 nM, 1.3 nM y 2.5 nM) de Docetaxel solo en comparación

con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Docetaxel y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Docetaxel solo.

EJEMPLO 12-12

Tratamiento con Lapatinib en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o Lapatinib 2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M solo o tratado con varias concentraciones (2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M) de Lapatinib en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 52a y 52b).

La figura 52a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Lapatinib 2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M, solo o en combinación. La figura 52b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Lapatinib 2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 52a y 52b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (2 μ M, 4 μ M, y 8 μ M) de Lapatinib solo en comparación con el grupo de control y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en los grupos tratados con Lapatinib y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Lapatinib solo.

EJEMPLO 12-13

Tratamiento con Everolimus en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con Everolimus 0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM solo o tratado con

diversas concentraciones (0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM) de Everolimus en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) no tratada con cualquier fármaco como grupo de control (figuras 53a y 53b).

La figura 53a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) con lactato de calcio 2.5 mM y Everolimus 0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM, solo o en combinación. La figura 53b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de riñón humano (Caki-1) con lactato de calcio 2.5 mM y Everolimus 0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 53a y 53b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (0.3 nM, 0.5 nM y 1 nM) de Everolimus solo como comparación con el grupo de control, y la capacidad de formación de colonias se suprime adicionalmente en el grupo tratado con Everolimus y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Everolimus solo.

EJEMPLO 12-14

Tratamiento con Trastuzumab (Herceptin) en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con el número de células de 1×10^3 células que muestran una resistencia a un fármaco anticanceroso Trastuzumab se sembraron en un medio RPMI1640 (incluyendo 1% de suero bovino fetal+500 ng/ μ l de factor de crecimiento epitelial) en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM o 0.23 μ g/ml, 0.45 μ g/ml, y 1.8 μ g/ml de Trastuzumab solo o tratado con varias concentraciones (0.23 μ g/ml, 0.45 μ g/ml, y 1.8 μ g/ml) de Trastuzumab en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figuras 54a y 54b).

La figura 54a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Trastuzumab 0.23 μ g/ml, 0.45 μ g/ml, y 1.8

µg/ml, solo o en combinación. La figura 54b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) con lactato de calcio 2.5 mM y Trastuzumab 0.23 µg/ml, 0.45 µg/ml, y 1.8 µg/ml, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 54a y 54b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias disminuye, en el grupo tratado con lactato de calcio solo en comparación con el grupo control, pero los grupos tratados con bajas concentraciones (0.23 µg/ml, 0.45 µg/ml, y 1.8 µg/ml) de Trastuzumab solo tiene poca diferencia en la capacidad de formación de colonias del grupo de control. Sin embargo, se confirmó que en los grupos tratados con 0.23 µg/ml, 0.45 µg/ml, y 1.8 µg/ml de Trastuzumab en combinación con lactato de calcio mostraron la capacidad de formación de colonias suprimida a un nivel inferior comparado con los grupos tratados con Trastuzumab solo que no mostró ningún efecto anticancerígeno.

EJEMPLO 12-15

Tratamiento con Oxaliplatino en combinación con lactato de calcio

La línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con el número de células de 1×10^3 células se sembraron en un medio RPMI1640 en cada una de las placas de 6 pozos. Después de un día, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se trataron con lactato de calcio 2.5 mM u Oxaliplatino 1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM solo o tratado con varias concentraciones (1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM) de Oxaliplatino en combinación con lactato de calcio 2.5 mM. A continuación, se compararon las capacidades formadoras de colonias de las células. En este caso, se usó una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) no tratada con cualquier fármaco se usó como un grupo de control (figura 55).

La figura 55a muestra el resultado de comparar la disminución en el número de colonias cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Oxaliplatino 1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM, solo o en combinación. La figura 55b muestra el resultado de comparar la supresión de la formación de colonia individual cuando se trató una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) con lactato de calcio 2.5 mM y Oxaliplatino 1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM, solo o en combinación. Como puede observarse en las figuras 55a y 55b, se confirmó que la capacidad de formación de colonias de las células cancerosas se suprimió, en el grupo tratado con lactato de calcio solo y los grupos tratados con bajas concentraciones (1.3 µM, 2.5 µM, y 5 µM) de Oxaliplatino solo en comparación con el grupo de control, y la capacidad formadora de colonias se

suprime adicionalmente en los grupos tratados con Oxaliplatino y lactato de calcio en combinación en comparación con los grupos tratados con Oxaliplatino solo. Este resultado se analizó para implicar que en el caso del tratamiento con lactato de calcio en combinación con un fármaco anticanceroso bien conocido, la eficacia del tratamiento anticanceroso puede mejorarse incluso con una menor cantidad de fármaco anticanceroso.

Por lo tanto, se puede mostrar la actividad anticancerosa mejorada cuando una célula cancerosa se trata con una sal metálica de lactato en combinación con un fármaco anticanceroso bien conocido, aunque la actividad anticancerígena se puede mostrar cuando una célula cancerosa se trata con una sal metálica de lactato sola. Además, puede verse a partir del resultado de Trastuzumab que la sensibilidad de una célula cancerosa a un fármaco anticanceroso bien conocido puede aumentarse adicionalmente.