(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201101521 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2012.09.28

(22) Дата подачи заявки
2010.05.11

(51) Int. Cl. ***A61K 31/122*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ЭПИМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ, МНОГОАСПЕКТНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ИЛИ ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ

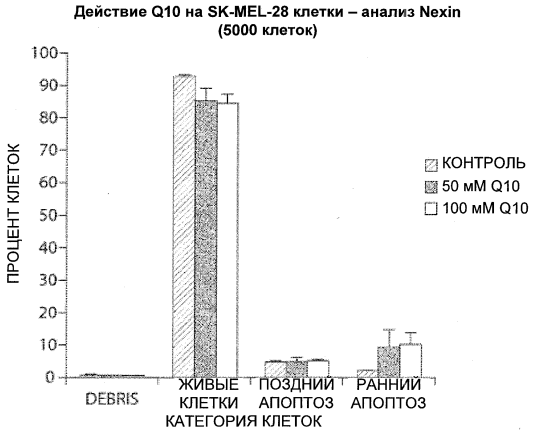
(31) **61/177,241; 61/177,243; 61/177,246; 61/177,244; 61/177,245**
(32) **2009.05.11**
(33) **US**
(86) **PCT/US2010/034376**
(87) **WO 2010/132440 2010.11.18**
(88) **2011.04.07**

(71) Заявитель:
БЕРГ БАЙОСИСТЕМЗ, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Нэрейн Найвен Раджин, Маккук Джон Патрик, Сарангараджан Рангапрасад (US)

(74) Представитель:
Соболев А.Ю. (RU)

(57) Описаны способы и композиции для лечения онкологических заболеваний у людей с использованием эпиметаболических переключателей, многоаспектных внутриклеточных молекул или факторов влияния.



201101521 A1

201101521 A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ЭПИМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ, МНОГОАСПЕКТНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ИЛИ ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ

Родственные заявки:

Настоящая заявка заявляет о приоритете предварительной заявки на патент США №61/177241, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения онкологических заболеваний, использующие эпиметаболический переключатель (Коэнзим Q10)" (Attorney Docket No.: 117732-00601), предварительной заявки на патент США № 61/177243, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения онкологических заболеваний, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспктные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00701), предварительной заявки на патент США № 61/177244, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы диагностики онкологических заболеваний, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспектные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00801), предварительной заявки на патент США № 61/177245, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения метаболических расстройств, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспктные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00901), и предварительной заявки на патент США № 61/177246, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы диагностики метаболических расстройств, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспктные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-01001). Полное содержание каждой из вышеперечисленных заявок включено в настоящую заявку путем ссылки.

Уровень техники:

Рак в настоящее время - одна из лидирующих причин смертности в развитых странах, и серьезная угроза современному обществу. Рак может развиться в любой ткани любого органа в любом возрасте. Во всем мире более чем у 10 миллионов человек каждый год диагностируется рак, и по оценке это число к

2020 году вырастет до 15 миллионов. Полагают, что рак является причиной шести миллионов смертей каждый год или 12% смертей в мире.

Этиология рака понятна не до конца. Рак за многие годы непрерывных исследований связывался со многими факторами, включая генетическую предрасположенность, нарушения, связанные с повреждением хромосом, вирусы, факторы окружающей среды и иммунологические нарушения. Рак включает в себя большую группу медицинских заболеваний. Раковые клетки могут появиться почти в любом органе и/или ткани тела. Рак развивается, когда клетки в определенной части тела начинают бесконтрольно расти или дифференцироваться.

Хотя недавние исследования чрезвычайно расширили наше понимание многих молекулярных механизмов онкогенеза и дали множество новых подходов к лечению рака, стандартным лечением для большинства злокачественных новообразований остается обширная резекция, химиотерапия и лучевая терапия. Хотя есть значительные улучшения, каждый из этих видов лечения может вызывать многочисленные нежелательные побочные эффекты. Например, хирургия может приводить к боли, травматическому повреждению здоровой ткани и рубцеванию. Лучевая терапия убивает преимущественно раковые клетки, но в то же время наносит ущерб нераковым тканям. Химиотерапия включает введение пациенту различных противораковых препаратов. Эти стандартные виды лечения часто сопровождаются неблагоприятными побочными эффектами, напр., тошнотой, подавлением иммунитета, изъязвлением кишечника и вторичными онкогенезами.

В течение многих лет многие отдельные исследователи и компании проводили обширные исследования в поиске улучшенных способов лечения различных видов рака. Компании разрабатывали биоактивные агенты, включая химические частицы, напр., маленькие молекулы, и биологические, напр., антитела, стремясь разработать более благотворные способы терапии рака. Некоторые из тестируемых биоактивных агентов работают и дают благотворные терапевтические эффекты для определенных людей или типов рака, другие же оказались неудачными или показывали минимальный терапевтический эффект в протоколах исследования. Другие биоактивные агенты исследовали, чтобы определить не полностью понятные механизмы действия.

Коэнзим Q10, также называемый здесь CoQ10, Q10, убихинон или убидекаренон, является популярной пищевой добавкой, и в капсульной форме может продаваться в продуктовых магазинах, магазинах здоровой пищи, аптеках и тому подобных магазинах, в качестве витаминоподобной добавки, помогающей защитить иммунную систему благодаря антиоксидантным свойствам убихинона, восстановленной формы CoQ10. CoQ10 известен специалистам и описан в международной публикации № WO 2005/069916, включенной в данное описание в полном объеме путем ссылки.

CoQ10 обнаруживается в большинстве тканей человеческого тела и тканях других млекопитающих. Тканевое распределение и окислительно-восстановительный потенциал CoQ10 у людей рассмотрены в обзорной статье Bhagavan HN, *et al.*, *Коэнзим Q10: Абсорбция, поглощение в тканях, метаболизм и фармакокинетика*, Free Radical Research 40(5), 445-453 (2006) (в дальнейшем, Bhagavan, *et al.*). Авторы сообщают, что "как общее правило, ткани с высокими энергетическими требованиями или метаболической активностью, такие как сердце, почки, легкие и мускулы, содержат сравнительно большие концентрации CoQ10." Авторы в дальнейшем сообщают, что "[a] основное количество CoQ10 в тканях находится в востановленной форме в виде гидрохинона или унихинона, исключение составляют мозг и легкие," что "видимо, отражает повышенный окислительный стресс в этих двух тканях." В частности, Bhagavan *et al.* сообщает, что в сердце, почках, легких, мускулах, кишечнике и крови (плазма), около 61%, 75%, 95%, 65%, 95% и 96%, соответственно, CoQ10 находится в востановленной форме. Подобным образом, Ruiz-Jiminez, *et al.*, *Определение убихинола-10 и убихинона-10 (коэнзим Q10) в сыворотке человека методом жидкостной хроматографии и масс-смектрометрии для оценки окислительного стресса*, J. Chroma A 1175(2), 242-248 (2007) (в дальнейшем Ruiz-Jiminez, *et al.*) сообщает, что при оценке количества Q10 и востановленной формы Q10 (Q10H2) в плазме человека большинство (90%) молекул было обнаружено в востановленной форме.

CoQ10 очень липофилен и практически нерастворим в воде. Вследствие его нерастворимости в воде, ограниченной растворимости в жирах и сравнительно большого молекулярного веса эффективность перорального приема CoQ10 является низкой. Bhagavan, *et al.* сообщает, что "в одном исследовании на крысах сообщалось, что было усвоено только около 2-3% орально введенного CoQ10."

Bhagavan, *et al.* также сообщает, что "данные исследований на крысах показывают, что CoQ10 восстанавливается до убихинола или во время, или сразу же после абсорбции в кишечнике."

CoQ10 в литературе связывается с раком в течение многих лет. Ниже описаны некоторые показательные, но не все включающие примеры упоминаний о CoQ10 в литературе. Karl Folkers, *et al.*, *Выживание пациентов, страдающих раком, в терапии с коэнзимом Q10*, Biochemical и Biophysical Research Communication 192, 241-245 (1993) (здесь после "Folkers, *et al.*") описывает восемь историй болезней раковых пациентов, "подвергавшихся терапии CoQ10" и их истории выживания "в течение 5-15 лет." CoQ10 орально вводился восьми пациентам, имевшим различные типы рака, включая карциному поджелудочной железы, аденокарциному, карциному гортани, рак груди, толстой кишки, легких и простаты. Folkers, *et al.* далее утверждает, что "эти результаты сейчас подтверждены системными протоколами." Lockwood, *et al.*, *Прогресс при терапии рака груди витамином Q10 и регрессия метастазов*, Biochemical и Biophysical Research Communication 212, 172-177 (1995) (в дальнейшем "Lockwood, *et al.*") в другой обзорной статье сообщает о "прогрессе в терапии рака груди с витамином Q10". Lockwood, *et al.* ссылается на Folkers, *et al.*, который "охватывает 35 лет международных исследований на животных и людях, которые обнаруживают различные уровни витамина Q10 в неопухолевых и опухолевых тканях и включают данные по витамину Q10, которые характерны для системы иммунной защиты, основываясь на повышенном выживании подвергнутых лечению мышей с опухолями". Lockwood, *et al.* далее утверждает, что "потенциал терапии витамином Q10 рака у человека стал очевиден в 1961", основываясь на исследовании, в котором определялся уровень CoQ10 в крови у 199 шведских и американских страдающих раком пациентов, которое показало различные уровни недостаточности в случаях рака молочной железы. Патент США № 6417233, опубликованный 9 июля 2002 года (в дальнейшем Sears, *et al.*) описывает композиции, содержащие жирорастворимые безнохиноны, напр., коэнзим Q10, для профилактики и/или лечения митохондриопатий. Sears, *et al.* далее утверждает, что "как сообщается, лечение CoQ10 дает определенную пользу пациентам с раком (см. колонку 2, строки 30-31)."

На дату подачи настоящее заявки, Национальный Институт Рака сообщает,

что хорошо спланированные клинические исследования CoQ10 в лечении рака, включающие большое число пациентов, не проводились с тех пор, как “было проведено огромное число исследований, и объем сообщаемой информации не прояснил, является ли причиной полезных эффектов коэнзим Q10 или что-то еще.” См. публикацию Национального Института Рака (NCI), доступную по адресу www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/coenzymeQ10/patient/allpages (29 сентября 2008 года). В частности, NCI ссылается на три небольших исследования использования CoQ10 во вспомогательной терапии после стандартного лечения пациентов с раком груди, в которых некоторым пациентам, по видимости, лечение помогало, и повторяет, что “недостатки в разработке плана исследования и представлении данных, однако, не дают ясности, является ли причиной полезных эффектов коэнзим Q10 или что-то еще.” The NCI отмечает, что “эти исследования имеют следующие недостатки: исследования не были рандомизированными или контролируемыми; пациенты использовали другие добавки в дополнение к коэнзиму Q10; пациенты получали стандартное лечение до или во время терапии Q10; и не сообщаются детали обо всех пациентах исследования.” NCI далее сообщает об “анекдотических сообщениях, что коэнзим Q10 помог некоторым пациентам с раком прожить дольше, включая пациентов с раками поджелудочной железы, легких, ободочной кишки, прямой кишки и простаты,” но утверждает, что ‘пациенты, описанные в этих исследованиях, однако, получали также лечение, отличное от коэнзима Q10, включая химиотерапию, лучевую терапию и хирургию.”

Публикация заявки на патент США 2006/0035981, опубликованная16 февраля 2006 года (в дальнейшем “Mazzio 2006”) описывает способы и композиции для лечения или предупреждения раков у людей и животных, с применением композиций, которые используют уязвимость раков, связанную с их анаэробной потребностью в неокислительном фосфорилировании глюкозы для получения энергии, что противоположно организму хозяина. Формулы Mazzio 2006 содержат один или более компонентов, которые синергетически стимулируют окислительный метаболизм и/или мешают дегидрогеназе молочной кислоты или анаэробному метаболизму глюкозы и более детально описаны как содержащие “2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон (здесь также называемый "DMBQ") (хиноидное основание) и варианты всего убихинонового ряда, включая

соответствующие гидрохиноны, убихроменолы, убихроманолы или синтезированные/природные производные и аналоги. *См.* Mazzio 2006, стр. 3, параграф 0010. В публикации Mazzio 2006 утверждается, что "короткая цепь убихинона (CoQ<3) является антираковым агентом» и далее утверждается, что "2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон (DMBQ) в 1000 раз сильнее, чем CoQ10, как антираковый агент." *См.* Mazzio 2006, стр. 3, параграф 0011. В публикации Mazzio 2006 далее говорится, что исследования "не обнаружили, что CoQ10 так летален, как ожидалось", "предыдущие исследования, где CoQ10 применялся против рака, были несколько противоречивыми". *См.* Mazzio 2006, стр. 3-4, где можно найти расширенный список цитат, подтверждающих это утверждение.

Публикация заявки на патент США 2007/0248693, опубликованаая 25 октября 2007 года (далее здесь "Mazzio 2007"), также описывает композиции пищевых добавок и их использование для лечения или предотвращения рака. Эта опубликованная заявка на патент опять сосредоточена на короткой цепи убихинонов и специально подчеркивает, что CoQ10 не является ключевым компонентом этого изобретения. В соответствии с публикацией Mazzio 2007, "если CoQ10 может повышать Vmax активности митохондриального комплекса II в раковых клетках (Mazzio и Soliman, Biochem Pharmacol. 67:1167-84, 2004), он не контролирует степень митохондриального дыхания или потребления O2 благодаря комплексу IV. И CoQ10 не оказывал такого летального действия, как ожидалось. Более того, результаты CoQ10 против рака были противоречивыми." См. Mazzio 2007, стр. 5, параграф 0019.

Сущность изобретения:

Заявители ранее описывали местные формулы CoQ10 и способы уменьшения скорости роста опухолей у животных (Hsia *et al.*, WO 2005/069916, опубликована 4 августа 2005 года). В экспериментах, описанных в Hsia *et al.*, показано, что CoQ10 увеличивает скорость апоптозов у культуры клеток рака кожи, но не у нормальных клеток. Более того, лечение животных с опухолями лекарственными формами CoQ10 для наружного применения показало резкое уменьшение скорости роста опухоли у животных.

Настоящее исследование основано, по меньшей мере частично, на более полном понимании роли CoQ10 у людей и/или клеток. В частности, способы и

композиции настоящего исследования основаны, по меньшей мере частично, на знании терапевтической активности CoQ10 для онкологических заболеваний, основанном на спланированных и выполненных клинических исследований человека и/или на введении CoQ10 отдельным людям и наблюдении неожиданных результатов, имевших место во время этих исследований и/или режимов лечения. Способы и рецептуры настоящего исследования в дальнейшем основывались, по меньшей мере частично, на понимании терапевтического механизма CoQ10, полученном на основе обширных исследований влияния CoQ10 на клетки *in vitro*.

Более точно, по меньшей мере в одном воплощении изобретения способы и композиции настоящего исследования основывались, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии, что применение Коэнзима Q10 (также называемого здесь CoQ10 или Q10) к клеткам приводит к избирательному вызову апоптозной реакции в раковых клетках, и не оказывает эффекта или, в некоторых случаях, оказывает позитивный эффект на рост нормальных клеток. Более того, по меньшей мере в одном дополнительном воплощении изобретения, было неожиданно обнаружено, что клеточные линии, берущие начало от агрессивных раков, были более чувствительны к CoQ10 (напр., требовалось более низкая концентрация и/или время воздействия CoQ10 для цитотоксичности и/или вызова апоптозов) по сравнению с клеточными линиями, берущими начало от менее агрессивных или неагрессивных раков. Наблюдался время- и дозозависимый эффект уровней митохондриального Q10, где через 48 часов уровень в митохондриях клеток возрос в шесть раз. В по меньшей мере одном дополнительном воплощении настоящего изобретения, оно дополнительно основано на неожиданном открытии, что Q10 сохраняется в замещенной окисленной форме (про-оксидантной) и не превращается в востановленную (анти-оксидантную) форму Q10H2 в каком-либо значительном количестве. В другом воплощении изобретение основывалось также на открытии, что экспрессия значительного числа генов модулируется в клетках, подвергавшихся воздействию окисленной формы Q10. Было обнаружено, что эти модулированные белки группируются в несколько клеточных путей метаболизма, включая апоптозы, биологию рака и рост клеток, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Взятые вместе, результаты, описанные здесь, дают новый взгляд на

терапевтический механизм Q10. Например, не имея намерения ограничиваться теорией, открытия заявителей показывают, что Q10 и, в особенности, описанная форма Q10, вызывает метаболический сдвиг в микроокружении клеток. Известно, что у раковых клеток особый метаболизм (эффект Варбурга), вследствие чего большинство раковых клеток вырабатывают энергию преимущественно путем гликолиза с последующей ферментацией молочной кислоты в цитозоле, а не путем окислительного фосфорилирования (окисления пирувата) в митохондриях. Открытия заявителей показывают, что Q10 способен переключать метаболический статус раковых клеток с анаэробного использования глюкозы на митохондриальное окислительное фосфорилирование.

Основываясь на данных заявителей, представленных здесь, Q10 идентифицируется как многоаспектная внутриклеточная молекула (МВМ) и как эпиметаболический переключатель (эпи-переключатель). В настоящем изобретеним предложены способы идентификации других МВМ и/или эпи-переключателей. Кроме того, в настоящем изобретении предложены МВМ, эпи-переключатели и способы для лечения окологических заболеваний с их использованием.

Соответственно, в изобретении предложен, в первом аспекте, способ лечения или предупреждения онкологических заболеваний у людей, способ, включающий введение человеку фактора влияния (фактор-в) в количестве, достаточном для лечения или профилактики онкологических заболеваний, где фактор влияния не является коэнзимом Q10, посредством этого леча или предотвращая онкологические заболевания у человека.

В связанном аспекте, в изобретении предложен способ лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессии или предотвращения онкологических заболеваний у млекопитающих, способ включает: введение при необходимости млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает в раковых клетках млекопитающих переключение клеточного энергетического метаболизма с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование, на уровни, наблюдаемые в нормальных клетках млекопитающих при нормлаьных физиологических условиях.

При использовании здесь термин “гликолиз” необязательно включает

связанный биосинтез лактата, при котором лактат образуется из пирувата.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния, по большей части, не вызывает переключения клеточного энергетического метаболизма с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование в нераковых клетках млекопитающих.

В некоторых воплощениях изобретения млекопитающим является человек, или не являющееся человеком млекопитающее.

В некоторых воплощениях изобретения, фактор влияния не является коэнзимом Q10, или его метаболитом или аналогом (включая аналоги, не имеющие или имеющие, по меньшей мере, один изопреновый повтор).

В некоторых воплощениях изобретения онкологическое заболевание реагирует или чувствительно к лечению коэнзимом Q10 или его метаболитами или аналогами.

В некоторых изобретения фактор влияния вызывает апоптозы или механизм смерти клетки в раковой клетке.

В некоторых изобретения фактор влияния ингибирует ангиогенез в раковых клетках.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния вызывает модуляцию связанных с иммунитетом элементов внутри микроокружения раковых клеток.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния вызывает изменение контроля клеточного цикла в раковых клетках.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния включает в себя: (a) бензохинон или, по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, и (b) по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных частиц к бензохиноновому кольцу.

В некоторых воплощениях изобретения, по меньшей мере, одна молекула, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, включает в себя: L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-тирозин, 4-гидрокси-фенилпируват, 3-метокси-4-гидроксиманделат (манделат ванилина или VMA), ванилиновую кислоту, пироксин или пантенол.

В некоторых воплощениях изобретения, по меньшей мере, одна молекула, которая способствует синтезу и/или прикреплению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу, включает в себя: фенилацетат, 4-гидрокси-бензоат, мевалоновую кислоту, ацетилглицин, ацетил-CoA или фарнезил.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния включает в себя: (a) один или несколько из L-фенилаланина, L-тирозина и 4-гидроксифенилпирувата; и, (b) один или несколько из 4-гидроксибензоаа, фенилацетата и бензохинона.

В некоторых воплощениях изобретения фактор влияния: (a) ингибирует экспрессию Bcl-2 и/или стимулирует экспрессию каспазы-3; и/или, (b) ингибирует клеточную пролиферацию.

В одном воплощении изобретения фактор-B является многоаспектной внутриклеточной молекулой (MBM). В некоторых воплощениях изобретения MBM выбирается из: альфа-кетоглутарата/ альфа-кетоглутаровой кислоты, малата/яблочной кислоты, сукцината/янтарной кислоты, глюкозамина, аденозина, аденозиндифосфата, глюкоуронида/глюкуроновой кислоты, никотиновой кислоты, динуклеотида никотиновой кислоты, аланина/фенилаланина, пиридоксина, тиамина или флавинадениндинуклеотида. В одном воплощении изобретения KBM выбирается из группы, состоящей из ацетил Co-A, пальмитоил Co-A, L-карнитина и аминокислот (напр., тирозина, фенилаланина и цистеина).

В одном воплощении изобретения фактор-в является эпиметаболическим переключателем (эпи-переключателем). В некоторых воплощениях изобретения эпиметаболический переключатель выбирается из: трансалдолазы, транскетолазы, сукцинил CoA синтазы, пируваткарбоксилазы или рибофлавина. В одном воплощении изобретения эпипереключатель выбирается из группы, состоящей из витамина D3 и компонентов ECM . В одном воплощении изобретения, ECM компоненты выбираются из группы, состоящей из фибронектина, иммуномодуляторов (напр., TNFα или любого интерлейкина, напр., IL-5, IL-12, IL-23), ангиогенных факторов; и факторов апоптоза.

В одном воплощении изобретения лечение получила выборка людей, и по меньшей мере 25% выборки имели системный уровень фактора влияния (напр., коэнзима Q10), который был терапевтическим для болезни, на которую было направлено лечение. В других воплощениях лечение получила выборка людей, и

по меньшей мере мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более из выборки имели системный уровень фактора влияния (напр., коэнзима Q10), который был терапевтическим для болезни, на которую было направлено лечение. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует считать частью этого изобретения, *напр.*, от 10% до 25%, от 15% до 35%, от 25% до 50%, от 35% до 60%, от 40% до 70%, от 50% до 75%, от 60% до 85% или от 70% до 90%.

В одном воплощении изобретения лечение получила выборка людей, и по меньшей мере у 25% из выборки наблюдалось уменьшение симптомов, что оценивалось по известным специалистам критериям, включая паталогию тканей, клинические наблюдения, фотографические анализы, компьютерную томографию, МРТ-сканирование, маркеры рака в крови, сыворотке или плазме.

В одном воплощении изобретения лечение получила выборка людей, и по меньшей мере у 50% наблюдалось уменьшение симптомов, что оценивалось по известным специалистам критериям, включая паталогию тканей, клинические наблюдения, фотографические анализы, компьютерную томографию, МРТ-сканирование, маркеры рака в крови, сыворотке или плазме.

В других воплощениях изобретения лечение получила выборка людей, и по меньшей мере у 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более из выборки наблюдалось уменьшение симптомов, что оценивалось по известным специалистам критериям, включая паталогию тканей, клинические наблюдения, фотографические анализы, компьютерную томографию, МРТ-сканирование, маркеры рака в крови, сыворотке или плазме. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует считать частью этого изобретения, *напр.*, от 10% до 25%, от 15% до 35%, от 25% до 50%, от 35% до 60%, от 40% до 70%, от 50% до 75%, от 60% до 85% или от 70% до 90%.

В различных воплощениях изобретения выборка людей, получивших лечение, могла составлять около 3 пациентов, около 5 пациентов, около 10 пациентов, около 15 пациентов, около 20 пациентов, около 25 пациентов, около 30 пациентов, около 35 пациентов, около 40 пациентов, около 50 пациентов, около 60 пациентов, около 70 пациентов, около 80 пациентов, около 90 пациентов, около

100 пациентов, около 125 пациентов, около 150 пациентов, около 160 пациентов, около 175 пациентов, около 200 пациентов, около 250 пациентов, около 300 пациентов, около 400 пациентов или более. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует считать частью этого изобретения, *напр.*, от около 10 до около 25, от около 15 до около 35, от около 25 до около 50, или от около 20 до около 160 пациентов.

Следует понимать, что специалист в данной области техники сможет, после изучения одного или более известных специалистам критериев, распознать, что у пациента наличествует улучшение симптомов, основываясь на общих знаниях в данной области. Например, специалист в данной области сможет изучить и сравнить фотографии раковых поражений кожи, таких как *in situ* кожная плоскоклеточная карцинома, до и после лечения (*напр.*, такие как фотографии, предоставленные здесь в качестве Примеров) и сможет распознать улучшение симптомов, основываясь на, например, улучшении в размере поражения, цвете поражения, или любых других видимых признаков поражения, обычно присущих раку. В другом примере специалист в данной области сможет изучить и сравнить тканевую патологию, *напр.*, рака кожи, до и после воздействия и сможет распознать улучшение симптомов, основываясь на изменении в тканевой паталогии, указывающем, *напр.*, на улучшение в онкогенности или тяжести рака. В другом примере специалист в данной области сможет изучить и сравнить изображение компьютерной томографии или изображения МРТ-сканирования опухоли или областей метастазных поражений до и после воздействия, сможет распознать улучшение симптомов, основываясь на, например, улучшении в размере первичной опухоли или улучшении в размере или числе метастазных повреждений.

В одном воплощении изобретения количество, достаточное для лечения онкологических заболеваний у человека, подавляет анаэробное использование глюкозы (и/или биосинтез лактата) и активирует митохондриальное окислительное фосфорилирование.

В одном воплощении изобретения онкологическое заболевание, которое лечат, не является онкологическим заболеванием, которое обычно лечат путем местного воздействия, напр., раком молочной железы или простаты, с ожиданием системной доставки активного агента на терапевтически эффективных уровнях.

В одном воплощении изобретения концентрация фактора-в в тканях человека, подвергающегося лечению, отличается от концентрации в контрольном стандарте ткани человека, находящейся в здоровом или нормальном состоянии.

В одном воплощении изобретения форма фактора-в, введенного человеку, отличается от преобладающей формы, находящейся в общей системе циркуляции у человека.

В одном воплощении изобретения воздействие проявляется вследствие взаимодействия фактора-в с геном, выбранным из группы генов, перечисленных в таблицах 1-28 (напр., таблицы 2-4, 6-28; особенно тех генов, активация или подавление которых показаны соответственно в тех же типах клеток с использованием различных методов оценки, или тех генов, активация или подавление которых соответственно показаны в различных типах клеток, теми же или отличными методами оценки; предпочтительно величина активации или подавления идентична или подобна (напр., максимальная степень увеличения или уменьшения не более чем 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, или 5-кратно от минимальной степени увеличения или уменьшения).

В одном воплощении изобретения воздействие проявляется вследствие взаимодействия фактора-в с белком, выбранным из группы, состоящей из HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансалдотазы 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазы, 4-гидробензоата, нейтрофильного цитозольного фактора 2, оксида азота синтазы 2A, супероксид дисмутазы 2, VDAC, Bax канала, ANT, Цитохрома c, комплекса 1, комплекса II, комплекса III, комплекса IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C, Cam Киназы II, и/или любого из генов, перечисленных в таблицах 1-28 (напр., таблицах 2-4, 6-28).

В одном воплощении изобретения онкологическое заболевание выбирается из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и саркомы.

В одном воплощении изобретения способ включает в себя также введение дополнительного терапевтического агента или терапевтического режима.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ лечения или профилактики агрессивного онкологического заболевания у людей, включающий в себя введение фактора влияния (фактора-в) людям в выбранной более низкой дозе, чем дозовый режим, используемый или выбранный для менее агрессивных

или неагрессивных онкологических заболеваний, тем самым леча или предотвращая агрессивное онкологическое заболевание.

В связанном аспекте изобретенияпредоставлен способ лечения или профилактики неагрессивного онкологического заболевания у людей, включающий в себя введение фактора влияния (фактора-в) людям в выбранной более высокой дозе, чем дозовый режим, используемый или выбранный для агрессивных онкологических заболеваний, тем самым леча или предотвращая неагрессивное онкологическое заболевание.

В одном воплощении изобретения онкологическое заболевание выбирается из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и саркомы.

В одном воплощении изобретения агрессивное онкологическое заболевание выбирается из группы, состоящей из карциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, саркомы Юинга, метастазирующего рака молочной железы, метастазирующей меланомы, рака мозга (астроцитома, глиобластома), нейроэндокринного рака, рака толстой кишки, рака легких, остеосаркомы, андроген-независимого рака простаты, рака яичников и неходжкинской лимфомы.

В одном воплощении изобретения неагрессивное онкологическое заболевание выбирается из группы, состоящей из неметастазируюего рака молочной железы, андроген-зависимого рака простаты, мелкоклеточного рака легких, острой лимфоцитной лейкемии.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя режим лечения, выбранный из группы, состоящей из хирургии, радиации, гормональной терапии, терапии антителами, терапии факторами роста, цитокинами, и химиотерапии.

В еще одном аспекте изобретения предоставлен способ для (избирательного) блокирования в раковых клетках млекопитающих, нуждающихся в лечении онкологического заболевания, анаэробного использования глюкозы (гликолиза) и усиления митохондриального окислительного фосфорилирования, способ включает в себя: введение млекопитающему терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного фактора-в для избирательного блокирования анаэробного использования глюкозы и для усиления митохондриального окислительного фосфорилирования в раковых клетках млекопитающего, по

сравнению с уровнями, наблюдаемыми в нормальных клетках млекопитающего при нормальных физиологических условиях.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя (1) активацию экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из набора генов, представленных в таблицах 1-28 (напр., 2-4 и 6-28), имеющих позитивное кратное изменение; и/или (2) подавления экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из набора генов, представленных в таблицах 1-28 (напр., 2-4 и 6-28) имеющих негативное кратное изменение.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя модуляцию экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансалдолазы 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазы, 4-гидробензоата, нейтрофильного цитозольного фактора 2, оксида азота синтазы 2A, супероксида дисмутазы 2, VDAC, Bax канала, ANT, Цитохрома c, комплекса 1, комплекса II, комплекса III, комплекса IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназы II.

В одном воплощении изобретения онкологическое расстойство выбирается из группы, состоящей из лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и саркомы.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя режим лечения, выбирающийся из группы, состоящей из хирургии, радиации, гормональной терапии, терапии антителами, терапии факторами роста, цитокинами и химиотерапии.

В еще одном аспекте изобретения предоставлен способ идентификации эффективного фактора влияния для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования или профилактики онкологического заболевания у млекопитающего, способ включает в себя: (1) получение болезненного биологического образца, содержащего раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток; (2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния; (3) определение уровня экспрессии одного или более маркеров, представленных в болезненных и нормальных биологических образцах, где маркер выбирается из группы, состоящей из маркеров, перечисленных в таблицах 1-28 (напр., таблицы 2-4 и 6-28), имеющих позитивное

кратное изменение и/или имеющих негативное кратное изменение; (4) сравнение уровня экспрессии одного или более маркеров в болезненном и нормальном биологических образцах; где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который увеличивает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих позитивное кратное изменение и/или снижает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих кратное изменение, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце.

В связанном аспекте изобретения предоставлен способ для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования, или профилактики онкологического заболевания у млекопитающего, способ включает в себя: (1) получение болезненного биологического образца, содержащего раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток; (2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния; (3) определение уровня экспрессии одного или более маркеров, представленных в болезненном и нормальном биологических образцах, где маркер выбирается из группы, состоящей из маркеров, перечисленных в таблицах 1-28, имеющих позитивное кратное изменение и/или негативное кратное изменение; (4) сравнение уровня экспрессии одного или более маркеров в болезненном и нормальном биологических образцах; где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который увеличивает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих позитивное кратное изменение и/или снижает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих негативное кратное изменение, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце; (5) введение млекопитающему эффективного фактора влияния; посредством этого лечится онкологическое заболевание у млекопитающих.

В еще одном связанном воплощении изобретения предоставлен способ идентификации эффективного фактора влияния для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования, или профилактики онкологического заболевания у млекопитающего, способ включает в себя: (1) получение болезненного биологического образца, содержащего раковые клетки

онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток; (2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния; (3) определение уровня гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования в болезненном и нормальном биологических образцах, до и после контакта с потенциальным фактором влияния, где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который повышает уровень митохондриального окислительного фосфорилирования и/или уменьшает уровень гликолиза, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце.

В еще одном связанном воплощении изобретения предоставлен способ идентификации эффективного фактора влияния для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования, или профилактики онкологического заболевания у млекопитающего, способ включает в себя: (1) получение болезненного биологического образца, содержащего раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток; (2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния; (3) определение уровня гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования в болезненном и нормальном биологических образцах, до и после контакта с потенциальным фактором влияния, где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который повышает уровень митохондриального окислительного фосфорилирования и/или уменьшает уровень гликолиза, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце и (4) введение млекопитающему эффективного фактора влияния; посредством чего лечится онкологическое заболевание у млекопитающих.

В некоторых воплощениях изобретения уровень гликолиза оценивается как ECAR, и/или где уровень митохондриального окислительного фосфорилирования оценивается как OCR.

В одном воплощении изобретения фактор-в не является коэнзимом Q10.

В дальнейшем аспекте изобретения предоставлен способ идентификации многоаспектной внутриклеточной молекулы (MBM), включающий в себя (a)

контакт клетки с эндогенной молекулой; (b) мониторинг действия эндогенной молекулы на профиль клеточного микроокружения; и (c) идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает изменение профиля клеточной микросреды, таким образом идентифицируется МВМ.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя сравнение влияния эндогенной молекулы на профиль клеточного микроокружения больной клетки и нормальной контрольной клетки; идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает различные изменения в профиле клеточной микросреды больной клетки и нормальной контрольной клетки; таким образом идентифицируется МВМ.

В одном воплощении изобретения действие на профиль клеточного микроокружения определяется путем оценки изменения уровня или активности клеточной молекулы, выбранной из группы, состоящей из мРНК, белков, липидов и метаболитов.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ идентификации эпиметаболического переключателя (эпи-переключателя), включающий в себя (a) сравнение молекулярных профилей двух или более клеток или тканей, где две или более клеток или тканей находятся на различных стадиях заболевания; (b) идентификация молекулы из молекулярных профилей, для которых изменение уровня коррелирует со стадией заболевания; (c) введение молекулы в клетку и (d) оценка возможности молекулы переключить метаболический статус клетки; где молекула, способная переключить метаболический статус клетки, идентифицируется как эпи-переключатель.

В одном воплощении изобретения молекулярный профиль выбирается из группы, состоящей из профиля метаболитов, профиля липидов, профиля белков или профиля РНК.

В одном воплощении изобретения молекула не оказывает негативного воздействия на здоровье или рост нормальных клеток.

В еще одном аспекте изобретения предоставлен способ идентификации агента, эффективного для лечения онкологического заболевания, который включает в себя: (1) предоставление потенциального фактора влияния; (2) определение способности фактора влияния переключать метаболический статус клетки; и (3) определение того, является ли потенциальный фактор влияния

эффективным для лечения онкологического заболевания; где потенциальный фактор влияния, способный переключать метаболический статус клетки и эффективный для лечения онкологического заболевания идентифицируется как агент, эффетивный для лечения онкологического заболевания.

В одном воплощении изобретения фактор-в идентифицируется как способный переключать метаболический статус клетки путем оценки изменений экспрессии одной или более мРНК, уровней липидов, уровней метаболитов, уровней биоэнергетических молекул, клеточной энергетики, функции митохондрий и числа митохондрий.

В еще одном аспекте изобретения предоставлена композиция, включающая агент, идентифицированный в соответствии с вышеописанными способами изобретения.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ лечения, облегчения симптомов, профилактики прогрессирования или предупреждения поддающегося воздействию CoQ10 нарушения или состояния у млекопитающих, способ включает в себя: введение нуждающемуся в соответствующем лечении млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей, по меньшей мере, один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает в больных клетках млекопитающего переключение клеточного энергетического метаболизма уровней гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования на наблюдаемые в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях.

В некоторых воплощениях изобретения поддающееся влиянию CoQ10 заболевание является онкологическим заболеванием.

Ожидается, что, если это приемлемо или специально не отрицается, любое из воплощений, описанных здесь, можно комбинировать с любым другим или более воплощениями, даже если воплощения описаны в различных аспектах изобретения.

Краткое описание фигур

Фигура 1: Чувствительность SK-MEL-28 к 24 часам воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 2: Чувствительность SKBR3 к 24 часам воздействия Q10,

оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 3: Чувствительность PaCa2 к 24 часам воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 4: Чувствительность PC-3 к 24 часам воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 5: Чувствительность HepG2 к 24 часам воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 6: Чувствительность MCF-7 к 24 часам воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фигура 7: Оценка апоптозных клеток после 24 часов воздействия Q10, оцененная по методу Apostrand ELISA.

Фигура 8: Пример гель-анализа на 2-D гель-электрофорезе. Отмечены точки, выбранные для идентификации.

Фигура 9: Сеть взаимодействий между белками, идентифицированными в 2-D гель электрофорезе, модулированными Q10 в SK-MEL-28 клетках.

Фигура 10: Пентозофосфатный путь, адаптированный по Verhoeven *et al.* (Am. J. Hum. Genet. 2001 68(5):1086-1092).

Фигура 11: 2-D гель богатого митохондриями материала SK-MEL-28 клеток. Отмечены точки, исключенные и идентифицированные путем масс-спектроскопии.

Фигура 12: Сравнительный график относительных количеств Q10, присутствующего в митохондриях SK-MEL-28 после экзогенного добавления 100 мкМ Q10 в культуральную среду.

Фигура 13: Карта известных процессов апоптозного пути.

Фигура 14: Анализ иммуноблоттингом Bcl-xl.

Фигура 15: Анализ иммуноблоттингом образцов SK-MEL-28, обработанных антителами Виментин.

Фигура 16: Анализ иммуноблоттингом лизиса клеток из различных клеточных линий, оцененный с помощью пяти антител к комплексам окислительного фосфорилирования (MitoSciences #MS601).

Фигура 17: Сравнение с помощью иммуноблоттинга уровней F1-альфа.

Фигура 18: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-III-Core 2.

Фигура 19: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-II-30.

Фигура 20: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-IV-COX II.

Фигура 21: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-I-20 (ND6).

Фигура 22: Анализ иммуноблоттингом различных типов клеток на пять митохондриальных белков.

Фигура 23: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на комплекс V белка C-V-α.

Фигура 24: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-III-Core 1.

Фигура 25: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Порин (VDAC1).

Фигура 26: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Циклофилин D.

Фигура 27: Сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Цитохром C.

Фигура 28: Теоретическая модель Q10 (сферическая), входящего в липид-связывающий канал HNF4альфа (1M7W.pdb) в открытую конформацию Helix 10.

Фигура 29: Графическое изображение эпидермальной концентрации CoQ10 у самцов свиней после лечения раскрытой здесь композицией, имеющей проникающий агент.

Фигура 30: Графическое изображение эпидермальной концентрации CoQ10 у самок свиней после лечения контрольной композицией.

Фигура 31: Фотографическое изображение целевого повреждения 1 до обработки.

Фигура 32: Фотографическое изображение целевого повреждения 1 после обработки.

Фигура 33: Фотографическое изображение целевого повреждения 2 до обработки.

Фигура 34: Фотографическое изображение целевого повреждения 2 после обработки.

Фигура 35: Фотографическое изображение целевого повреждения 3 до обработки.

Фигура 36: Фотографическое изображение целевого повреждения 3 после обработки.

Фигура 37: OCR в HDFa клетках в разном глюкозном состоянии в норме и при гипоксии.

Фигура 38: OCR в HASMC клетках в разном глюкозном состоянии в норме и при гипоксии.

Фигура 39: OCR значения в MCF-7 клетках рака молочной железы в отсутствие и в присутствии 31510 и стрессоров.

Фигура 40: OCR значения в PaCa-2 раковых клетках поджелудочной железы в отсутствие и в присутствии 31510 и стрессоров.

Подробное описание изобретения:

I. Общие описания и определения

При использовании здесь каждый из следующих терминов имеет значение, соответствующее ему в этом разделе.

Термины в единственном числе, используемые в настоящем документе, относятся к одному или более (т.е., по меньшей мере, к одному) грамматическому объекту статьи. Например, «один элемент» обозначает один элемент или более одного элемента.

Термин "включая" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с фразой "включая, но не ограничиваясь".

Термин "или" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с термином "и/или," если только контекст прямо не оуказывает на другое.

Термин "такой как" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с фразой "такой как, но не ограничиваясь".

"Пациент" или "субъект", подвергнутый лечению по способу изобретения,

может означать или человека, или не являющееся человеком животное, предпочтительно млекопитающее. Надо отметить, что клинические наблюдения, описанные здесь, были проведены на людях, и, по меньшей мере в некоторых модификациях, субъектами являются люди.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, которое, будучи введено пациенту для лечения болезни, достаточно для оказания эффекта лечения болезни. Если соединение вводится для профилактики болезни, количество достаточно для избежания или отсрочки наступления болезни. "Терапевтически эффективное количество" будет варьировать в сильной зависимости от соединения, болезни и ее серьезности и возраста, веса и тому подобного у пациента, подвергаемого лечению.

"Профилактика" или "предотвращение" относится к уменьшению риска развития болезни или заболевания (т.е., причиной того, что по крайней мере один из клинических симптомов болезни не разовьется у пациента, который может быть подвержен или предрасположен к болезни, но еще не иметь ее или не показывать симптомов болезни).

Термин "профилактическое" или "терапевтическое" количество относится к введению субъекту одной или более композиций, о которых идет речь. Если введение предшествует клиническому проявлению нежелаемого состояния (напр., болезни или другого нежелаемого состояния организма), тогда воздействие является профилактическим, т.е. оно предотвращает развитие в организме нежелательного состояния, а в случае если введение происходит после проявления нежелательного состояния, воздействие является терапевтическим (т.е., имеет своей целью уменьшить, улучшить или поддержать существующее нежелательное состояние или его побочные эффекты).

Термин "терапевтический эффект" относится к местному или системному эффекту у животных, особенно млекопитающих, и в первую очередь человека, причиной которого является фармакологически активное вещество. Термин таким образом относится к любому веществу, которое намереваются использовать для диагностики, курса лечения, облегчения, лечения или предовтращения болезни или в увеличении желаемого физического или ментального развития и условий у животных или людей. Фраза "терапевтически эффективное количество" означает, такое количество вещества, которое производит определенное желаемое местное

или системное действие в приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. В некоторых вариантах воплощения терапевтически эффективное количество вещества будет зависеть от его терапевтического индекса, растворимости и тому подобного. Например, определенные композиции, раскрытые в способах настоящего изобретения, могут вводиться в достаточном количестве для получения обоснованного соотношения преимущество/риск, применимого к такому лечению.

"Пациент" означает любое животное (напр., человек или не являющееся человеком млекопитающее), которое может быть субъектом, по меньшей мере, одного медицинского вмешательства (напр., лечения, диагностики/прогностических тестов, и т.д.), включая лошадей, собак, кошек, свиней, коз, кроликов, хомяков, обезьян, морских свинок, крыс, мышей, ящериц, змей, коров, рыб и птиц.

"Метаболический путь" относится к последовательности энзим-опосредованных реакций, которые трансформируют одно соединение в другое и предоставляют промежуточные продукты и энергию для клеточных функций. Метаболический путь может быть линейным или цикличным.

“Метаболический статус” относится к молекулярному содержанию в определенной клеточной, многоклеточной или тканевой среде в определенный момент времени, оцененному по различным химическим и биологическим показателям, которые имеют отношение к состоянию здоровья или болезни.

Термин "микрочип" относится к совокупности определенных полинуклеотидов, олигонуклеотидов, полипептидов (напр., антител) или пептидов, синтезированных на субстрате, таком как бумага, нейлон или другой тип мембраны, фильтра, тонкой пластинки, стеклянной пластинки или любой другой твердой подложки.

Термины "заболевания" и "болезни" используются взаимозаменяемо и относятся к любому отклонению от нормальной структуры или функции любой части, органа или системы организма (или любой их комбинации). Определенная болезнь выражается по характерным симптомам и признакам, включая биологические, химические и физические изменения и часто связывается с множеством других факторов, включая, но не ограничиваясь, демографическим, окружащей среды, генетическим и медицинским историческим факторами.

Определенные характерные признаки, симптомы и соответствующие факторы могут быть подсчитаны различными методами для получения важной диагностической информации.

Термин "экспрессия", используемый здесь, означает процесс, по которому полипептид образуется из ДНК. Процесс включает транскрипцию на гене мРНК и трансляцию на этой мРНК полипептида. В зависимости от контекста, в котором это выражение используется, "экспрессия" может относиться к образованию РНК, белка или и того, и другого.

Термин «уровень экспрессии гена» относится к уровню мРНК, а также пре-мРНК, образующихся трнасприптов РНК, промежуточных транскриптов, зрелой(ых) мРНК и продуктов распада, или к уровню белка, кодируемого этим геном в клетке.

Термин "модуляция" относится к положительному регулированию (т.е. активации или стимуляции), отрицательному регулированию (т.е. ингибированию или супрессии) в качестве реакции, или к тому и другому в комбинации или отдельно. "Модулятор" является композицией или молекулой, которая модулирует, и может быть, например, агонистом, антагонистом, активатором, стимулятором, супрессором или ингибитором.

Термин “промежуточный продукт биосинтеза коэнзима”, используемый здесь, характеризует те соединения, которые образуются при химическом/биологическом превращении тирозина и Ацетил-СоА в убихинон. Промежуточные продукты биосинтеза коэнзима включают 3-гексапренил-4-гидроксибензоат, 3-гексапренил-4,5-дигидроксибензоат, 3-гексапренил-4-гидрокси-5-метоксибензоат, 2-гексапренил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-гексапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-гексапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 3-октапренил-4-гидроксибензоат, 2-октапренилфенол, 2-октапренил-6-метолксифенол, 2-октапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-октапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-6-метоксифенол, 3-декапренил-4-гидрокси-5-метоксибензоат, 3-декапренил-4,5-дигидроксибензоат, 3-декапренил-4-гидроксибензоат, 4-гидроксифенилпируват, 4-гидроксифениллактат, 4-

гидроксибензоат, 4-гидрокициннамат и гексапренидифосфат.

Термин "Троламин," используемый здесь, относится к Троламину NF, Триэтаноламину, TEAlan ®, TEAlan 99%, Триэтаноламину, 99%, Триэтаноламину, NF или Триэтаноламину, 99%, NF. Эти термины могут быть использованы здесь взаимозаменяемо.

В некоторых модификациях соединения настоящего изобретения, *напр.*, МВМ или эпи-переключатели, описанные здесь, могут быть использованы для лечения поддающегося влиянию Коэнзима Q10 состояния у субъектов, нуждающихся в таком лечении. Выражение "поддающееся влиянию коэнзима Q10 состояние," или "поддающееся влиянию CoQ10 состояние/болезнь," включает болезни, расстройства, состояния, которые можно лечить, предотвращать или иным образом облегчать путем введения коэнзима Q10. Не имея стремления ограничиваться какой-либо определенной теорией, и как будет в дальнейшем описано здесь, полагается, что функции CoQ10, по меньшей мере частично, состоят в вызове метаболического переключения в микроокружении клетки, таком как переключение на тип и/или уровень окислительного фосфорилирования в клетках с нормальным состоянием. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения поддающиеся влиянию CoQ10 состояния являются состояниями, которые возникают вследствие измененного метаболизма в клеточном микроокружении. Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния включают, например, онкологические заболевания, которые, например, могут смещаться в сторону гликолиза и биосинтеза лактата. В некоторых вариантах воплощения изобретения поддающиеся влиянию CoQ10 онкологические заболевания включают рак легких, рак поджелудочной железы, рак молочных желез, рак простаты, рак печени или рак костей, плоскоклеточные карциномы, базальноклеточные карциномы, меланомы и актинические кератозы, в числе прочих. Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния включают также другие онкологические заболевания, как описано в настоящем документе.

Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния также включают, например, метаболические расстройства, такие как ожирение, диабеты, преддиабетные состояния, метаболический синдром и эндокринные нарушения. Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния включают, кроме того, другие метаболические расстройства, в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения, *напр.*, МВМ или эпи-переключатели, описанные здесь, действуют подобно коэнзиму Q10. При использовании в настоящем документе фраза “действовать подобно коэнзиму Q10” означает способность соединения демонстрировать, по меньшей мере, частично такое же или подобное действие, как коэнзим Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения демонстрируют 25% или более от действия коэнзима Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения демонстрируют до 130% от действия коэнзима Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения, соединения настоящего изобретения демонстрируют около 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, 116%, 117%, 118%, 119%, 120%, 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 126%, 127%, 128%, 129%, или 130% действия коэнзима Q10. Следует понимать, что каждое значение, перечисленное в этом параграфе, можно модифицировать термином «около». Кроме того, следует понимать, что значение в любом диапазоне, который находится между любыми двумя величинами, перечисленными в этом параграфе, тем самым входит в настоящее изобретение. Например, в некоторых вариантах воплощения соединения настоящего изобретения демонстрируют действие коэнзима Q10 между около 50% и около 100%. В некоторых вариантах воплощения действием, которое подобно у коэнзима Q10 и соединений настоящего изобретения, является способность вызывать переключение клеточного метаболизма. В некоторых вариантах воплощения изобретения действие, которое подобно у CoQ10 и у соединений настоящего изобретения, оценивается по НРК (норма расхода кислорода, OCR) и/или НВКО (норма внеклеточного окисления, ECAR).

При использовании здесь, "онкологическое заболевание" относится ко всем типам раковых или злокачественных опухолей или неоплазм, обнаруженных у людей, включая, не ограничиваясь: лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и

саркомы. При использовании здесь, термины или выражения “онкологическое заболевание”, "рак", "неоплазма" и "опухоль" используются взаимозаменяемо и или в единственной, или во множественной форме, относятся к клеткам, которые подверглись злокачественному перерождению, которое сделало их патологичными для организма носителя. В некоторых вариантах воплощения онкологическое заболевание является поддающимся влиянию коэнзима Q10 состоянием.

В некоторых вариантах воплощения изобретения онкологическое заболевание или рак характеризуется отсутствием апоптозов. В других вариантах воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется повышенным ангиогенезом. В других вариантах воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется деградацией внеклеточного матрикса (ВКМ). В еще одних вариантах воплощения, онкологическое заболевание или рак характеризуется потерей контроля клеточного цикла. В еще одних вариантах воплощения, онкологическое заболевание или рак характеризуется переключением метаболического управления с митохондриального окислительного фосфорилирования на увеличение использования и/или зависимости от поступления лактата и гликолиза. В следующих вариантах воплощения, онкологическое заболевание или рак характеризуется адаптированными иммуномодуляторными механизмами, помогающими избегнуть иммунного надзора. В одном варианте воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется, по меньшей мере, двумя из вышеперечисленных характеристик, напр., возрастанием ангиогенеза и деградацией ВКМ. В одном варианте воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется, по меньшей мере, тремя из вышеперечисленных характеристик. В одном варианте воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется, по меньшей мере, четырьмя из вышеперечисленных характеристик. В одном варианте воплощения онкологическое заболевание или рак характеризуется, по меньшей мере, пятью из вышеперечисленных характеристик. В одном варианте воплощения, онкологическое заболевание или рак характеризуется всеми шестью из вышеперечисленных характеристик.

Соответственно, в некоторых вариантах воплощения соединения настоящего изобретения действуют, восстанавливая способность к апоптозам или

вызывая апоптозы. В других вариантах воплощения соединения настоящего изобретения действуют, ослабляя, снижая или подавляя ангиогенез. В еще одних вариантах воплощения соединения настоящего изобретения действуют, восстанавливая внеклеточный маткрикс. В других вариантах воплощения, соединения настоящего изобретения действуют, восстанавливая контроль клеточного цикла. В еще одних вариантах воплощения соединения настоящего изобретения действуют, переключая управление метаболизмом обратно с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование. В следующих вариантах воплощения соединения настоящего изобретения действуют, возвращая иммунный надзор или восстанавливая способность организма распознавать раковые клетки как чужеродные.

Не имея стремления ограничиваться какой-либо определенной теорией, полагаем, что обычно существует скоординированный каскад событий, которые в совокупности приводят к развитию рака. Таким образом, в некоторых воплощениях рак не проявляет простой зависимости 1 ген - 1 белок – основная причинно-следственная связь. В некоторых воплощениях рак является физиологическим болезненным состоянием, которое выражается в изменениях ткани и перестройках, которые приводят к образованию опухолей, изменяют состояние ткани, напр., энергетическое, подрывают целостность внеклеточного матрикса, что приводит к возможности образования метастаз, отсутствии иммунного надзора и/или измененном состоянии ангиогенеза.

Первичные раковые клетки (то есть клетки, близкие к злокачественной трансформации) можно легко отличить от нераковых клеток с помощью хорошо известных техник, в частности при гистологичеком исследовании. Определение раковой клетки, используемое здесь, включает не только первичные раковые клетки, но также стволовые раковые клетки, а кроме того предраковые клетки или любые клетки, образовавшиеся от предшественника раковой клетки. Это включает метастазировавшие раковые клетки, и культуры in vitro и клеточные линии, образовавшиеся от раковых клеток. Если речь идет о типе рака, который обычно проявляется как солидная опухоль, "клинически определяемая" опухоль является опухолью, которая определяется на основании массы опухоли, напр, с помощью таких процедур, как компьютерная томография, МР-томография, рентген, ультразвуковое обследование или пальпация, и/или которая определяется на

основании экспрессии одного или более ракоспецифичных антигенов в образце, взятом от пациента.

При использовании здесь, “позитивное кратное изменение” относится к “положительной регуляции” или “возрастанию (экспрессии)” генов, которые перечислены в соответствующих таблицах.

При использовании здесь, “негативное кратное изменение” относится к “отрицательной регуляции” или “снижению (экспресии)” генов, которые перечислены в соответствующих таблицах.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, где определенные перечисленные гены связаны более чем с одним из условий лечения, таким как различные временные периоды после лечения, или лечения различными концентрациями потенциального фактора влияния (напр., CoQ10), кратное изменение определенного гена относится к самому длинному зарегистрированному промежутку времени. В других вариантах воплощения кратное изменение определенного гена относится к самому короткому зарегистрированному промежутку времени. В других вариантах воплощения кратное изменение определенного гена относится к лечению самой высокой концентрацией фактора-в (напр., CoQ10). В других вариантах воплощения кратное изменение определенного гена относится к лечению самой низкой концентрацией фактора-в (напр., CoQ10). В других вариантах воплощения кратное изменение определенного гена относится к модуляции (напр., положительной или отрицательной регуляции), согласованной с терапевтическим эффектом фактора-в.

В определенных вариантах воплощения позитивное или негативное кратное изменение относится к любому из генов, перечисленных в любой из таблиц 1-28 (напр., 2-4 и 6-28). В определенных вариантах воплощения позитивное или негативное кратное изменение относится к любому из генов, перечисленных в любой из таблиц 1-28 (напр., 2-4 и 6-28), за исключением одной из таблиц (напр., за исключением таблицы 1, за исключением таблицы 5, и т. д.). В определенных вариантах воплощения, позитивное или негативное кратное изменение относится к любому из генов, перечисленных в любой из таблиц 1-28 (напр., 2-4 и 6-28), за исключением любых двух таблиц (напр., за исключением таблиц 1 и 5, за исключением таблиц 2 и 16, и т.д.). В определенных вариантах воплощения позитивное или негативное кратное изменение относится к любому

из генов, перечисленных в любой из таблиц 1-28 (напр., 2-4 и 6-28), за исключением любых трех таблиц; или за исключением любых четырех таблиц; или за исключением любых 5, 6, 7, 8, 9, 10, или более таблиц. В определенных вариантах воплощения позитивное или негативное кратное изменение относится к любому из генов, перечисленных в любой из таблиц 1-28 (напр., 2-4 и 6-28), за исключением таблиц 1, 5, 9, и 12.

Теперь будет сделана детальная ссылка на предпочитаемые воплощения изобретения. Хотя изобретение будет описано в соответствии с предпочтительными воплощениями, следует понимать, что изобретение не следует ограничивать этими предпочтительными воплощениями. Напротив, изобретение включает альтернативы, модификации и эквиваленты, которые можно включить в объем и область изобретения, как определено в приложенной формуле.

II. Факторы влияния на внутреннюю среду

В настоящем изобретении представлены способы лечения онкологических заболеваний путем введения фактора влияния на внутреннюю среду. “Факторы влияния на внутреннюю среду” (факторы влияния, B-факторы) являются молекулами, которые благотворным образом влияют или модулируют болезненную внутреннюю среду человека или не являющегося человеком млекопитающего, давая возможность болезненной внутренней среде измениться, восстановив или поддержав нормальную или здоровую внутреннюю среду, что приводит к нормальному состоянию. Эпи-переключатели включают как многоаспектные внутриклеточные молекулы (MBM), так и эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели), определенные ниже.

В определенных вариантах вополощения, MBM и эпи-переключатели, раскрытые здесь, включают те, которые обычно используются в качестве пищевых добавок. В определенных вариантах вополощения, эти MBM и/или эпи-переключатели, раскрытые здесь, являются фармацевтической маркой. В определенных вариантах вополощения, MBM и/или эпи-переключатели, имеющие фармацевтическую марку, имеют чистоту между около 95% и около 100% и включают все значения между 95% и 100%. В определенных вариантах

воплощения, чистота МВМ и/или эпи-переключателей составляет 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,9 или 100%. В определенных вариантах воплощения МВМ и/или эпи-переключатели свободны или практически свободны от эндотоксинов. В других вариантах воплощения МВМ и/или эпи-переключатели свободны или практически свободны от чужеродных белковых веществ. В определенных вариантах воплощения МВМ и/или эпи-переключателем является CoQ10.

1. Многоаспектная внутриклеточная молекула (МВМ)

Термин "многоаспектная внутриклеточная молекула (МВМ)", является выделенной версией или синтезированной версией эндогенной молекулы, которая в природе образуется в организме и/или присутствует, по меньшей мере, в одной клетке человека. МВМ характеризуется одной или более, двумя или более, тремя или более или всеми следующими функциями. МВМ способны проникать в клетку, и проникновение в клетку включает полное или частичное проникновение в клетку, пока биологически активная часть молекулы полностью не войдет в клетку. МВМ способны запускать механизмы сигнальной трансдукции и/или экспрессии генов в клетке. МВМ являются многоаспектными, поскольку молекулы одновременно обладают как терапевтическим действием, так и являются носителем, т.е. переносчиком лекарства. МВМ также являются многоаспектными, поскольку молекулы одним образом действуют на состояние болезни и другим образом на нормальное состояние. Например, в случае CoQ-10, введение CoQ-10 в клетки меланомы в присутствии VEGF приводит к снижению уровня Bcl2, который, в свою очередь, приводит к снижению онтогенетического потенциала клеток меланомы. Напротив, в нормальном фибробласте, при одновременном введении CoQ-10 и VEFG эффект на уровни Bcl2 не оказывается. Предпочительно, МВМ избирательно действует на клетки в состоянии болезни, и по большей части не оказывает эффекта на (соседние) клетки в нормальном состоянии. Предпочтительно, МВМ избирательно оказывает влияние на клетки в болезненном состоянии, близкие по фенотипу, метаболическому статусу, генотипу, уровням экспрессии мРНК/белков, и т.д., приближая клетки к нормальному состоянию.

В одном варианте воплощения, МВМ является также эпи-переключателем.

В другом варианте воплощения МВМ не является эпи-переключателем. Специалист в данной области техники поймет, что подразумевается, что МВМ изобретения также включает в себя смесь двух или более эндогенных молекул, где смесь характеризуется одной или более вышеупомянутых функций. Эндогенные молекулы в смеси представлены в таком соотношении, что смесь действует как МВМ.

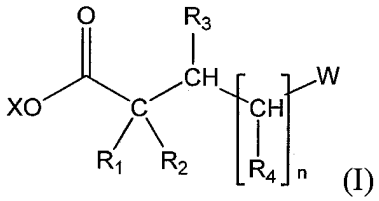
МВМ могут быть молекулами, имеющими липидную основу, или не имеющими липидной основы. Примеры МВМ включают, не ограничиваясь, CoQ10, ацетил Co-A, пальмитил Co-A, L-карнитин, аминокислоты, такие как, например, тирозин, фенилаланин и цистеин. В одном воплощении МВМ является маленькой молекулой. В одном воплощении изобретения МВМ не является CoQ10. МВМ может идентифицировать обычным образом любой специалист, используя любой из анализов, подробно описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения МВМ включает соединения семейства витаминов В, или нуклеотиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, которые содержат соединения семейства витаминов В. Соединения семейства витаминов В включают, например, тиамин (витамин В1), ниацин (также известный как никотиновая кислота или витамин В3), или пиридоксин (витамин В6), а также провитамины, такие как пантенол (провитамин В5). В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из тиамина, ниацина и пиридоксина. Нуклеозиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, в состав которых входят соединения семейства витаминов В, включают, например, нуклеозиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, в состав которых входит молекула аденина или ниацина (никотиновой кислоты). В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из аденозина, аденозиндифосфата (АДФ), флавин аденозин динуклеотида (ФАД, который содержит части витамина В2 и АДФ) и динуклеотид никотиновой кислоты.

В других вариантах воплощения МВМ включает аминокислоты. Примеры аминокислот включают, например, тирозин (напр., L-тирозин), цистеин, фенилаланин (*напр.*, L-фенилаланин) и аланин. В некоторых вариантах воплощения, аминокислотой является фенилаланин или аланин. В некоторых вариантах воплощения, МВМ включает производные аминокислот, такие как 4-гидроксифенилпируват или ацетилглицин.

В некоторых вариантах воплощения МВМ является аналогом глюкозы, *напр.*, молекулой глюкозы, где одна группа -OH или $-CH_2OH$ замещена группой -COOH, $-COO^-$ или $-NH_2$. Примеры аналогов глюкозы включают глюкозамин, глюцицронид и глюкуронат.

В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из соединений формулы (I):



(I)

где

n является целым числом из 0 или 1;

R^1, R^2, R^3 и R^4, при их наличии, каждый независимо выбирается из водорода и гидроксила, или R^1 и R^2 вместе с углеродом, к которому они присоединяются, образуют карбонильную (C=O) группу;

W является -COOH или $-N(CH_3)_3^+$; и

X является водородом, отрицательно заряженным или катионом щелочного металла, такого как Na^+

Понятно, что когда n равно 0, CHR^3 группа связана с заместителем W.

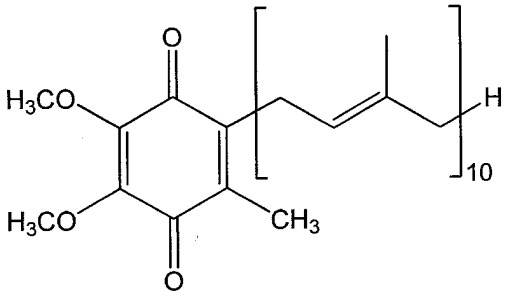
В некоторых вариантах воплощения W является $-N(CH_3)_3^+$. В некоторых вариантах воплощения МВМ является карнитином, таким как L-карнитин.

В некоторых вариантах воплощения МВМ является дикарбоновой кислотой. В некоторых вариантах воплощения W является -COOH. В некоторых вариантах воплощения R^3 является водородом. В некоторых вариантах воплощения n равно 0. В некоторых вариантах воплощения каждый из R^1 и R^2 независима являются водородом. В некоторых вариантах воплощения W является -COOH, R^3 является водородом, n равно 0, и каждый из R^1 и R^2 независимо являются водородом. В некоторых вариантах воплощения n равно 1. В некоторых вариантах воплощения R^1 и R^2 берутся вместе с углеродом, к которому они присоединены, образуя карбонильную (C=O) группу. В некоторых вариантах воплощения , R^4 является водородом. В некоторых вариантах воплощения , R^4 является гидроксилом. В некоторых вариантах воплощения , W является -COOH,

R^3 является водородом, n равно 1 и R^1 и R^2 берутся вместе с углеродом, к которому они присоединены, образуя карбонильную (C=O) группу.

В некоторых вариантах воплощения МВМ является промежуточным продуктом цикла Кребса, излишки которого сдвигают цикл Кребса в сторону окислительного фосфорилирования. Примеры промежуточных продуктов цикла Кребса, которые являются МВМ, включают янтарную кислоту или сукцинат, яблочную кислоту или малат, и α-кетоглутаровую кислоту или α-кетоглутарат.

В некоторых вариантах воплощения МВМ является строительным блоком CoQ10, который имеет следующую структуру:



Таким образом, строительные блоки CoQ10 включают, не ограничиваясь, фенилаланин, тирозин, 4-гидроксифенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидроксиманделат, ванилиновую кислоту, 4-гидрокибензоат, мевалоновую кислоту, фарнезил, 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон, а также их соответствующие кислоты или ионы. В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из фенинлаланина, тирозина, 4-гироксифенилпирувата, фенилацетата и 4-гидроксибензоата.

(i) Способы идентификации МВМ

В настоящем изобретении представлены способы идентификации МВМ. Способы идентификации МВМ включают, в целом, экзогенное добавление к клетке эндогенной молекулы и оценку действия на клетку, *напр.*, на профиль микроокружения клетки, которое производит эндогенная молекула. Действие на клетку оценивается по следующим параметрам (один или несколько): клеточное строение, мРНК, белки, липиды и/или метаболический уровень, для идентификаци изменений в профиле клеточной микросреды. В одном варианте воплощения клетки являются культивируемыми клетками, *напр.*, in vitro. В одном варианте воплощения клетки находятся в организме. Эндогенная молекула может быть добавлена в клетку в одной концентрации или может быть добавлена в клетку в

различных концентрациях. В одном варианте воплощения эндогенная молекула добавляется к клеткам так, что уровень эндогенной молекулы в клетках поднимается (*напр.*, поднимается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше) по сравнению с уровнем эндогенной молекулы в контрольной клетке, не подвергавшейся воздействию.

Молекулы, которые вызывают изменение в клетке, как определяется по изменениям, например, в следующих параметрах (одному или нескольким): морфологии, физиологии и/или составу (*напр.*, мРНК, белки, липиды, метаболиты), могут, кроме того, оцениваться для определения, различаются ли вызываемые изменения в профиле клеточной микросреды между болезненным клеточным состоянием и нормальным клеточным состоянием. Клетки (*напр.*, линии клеточных культур) различного тканевого происхождения, клеточного типа или состояния, могут быть оценены путем сравнительной оценки. Например, изменения, вызванные в профиле клеточной микросреды раковой клетки, могут быть сравнимы с изменениями, вызванными в нераковой или нормальной клетке. Эндогенная молекула, которая, как наблюдается, вызывает изменения в профиле микросреды клетки (*напр.*, вызывает изменения в морфологии, физиологии и/или составу, *напр.*, мРНК, белки, липиды или метаболиты в клетке и/или различным образом (*напр.*, предпочтительно) вызывает изменения в профиле клеточной микросреды в болезенной клетке по сравнению с нормальной клеткой, идентифицируется как МВМ.

МВМ изобретения могут быть МВМ, имеющими липидную основу, или МВМ, не имеющими липидной основы. Способы идентификации МВМ, имеющих липидную основу, включают вышеописанные базовые клеточные способы, в которых имеющая липидную основу эндогенная молекула экзогенно добавляется к клетке. В предпочтительном варианте воплощения, имеющая липидную основу эндогенная молекула добавляется к клетке таким образом, что уровень имеющей липидную основу эндогенной молекулы в клетке повышается. В одном варианте воплощения уровень имеющей липидную основу эндогенной молекулы повышается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30

раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше по сравнению с уровнем в контрольных клетках, не подвергавшихся воздействию. Формула и доставка молекулы с липидной основой в клетку зависит от свойств каждой исследуемой молекулы, но многие способы известны специалистам. Примеры формулы и доставки молекул с липидной основой, включают, не ограничиваясь, солюбилизацию ко-растворителями, молекулы-переносчики, липосомы, дисперсии, суспензии, дисперсии наночастиц, эмульсии, *напр.*, эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», мультифазные эмульсии, *напр.*, эмульсии типа «масло в воде в масле», полимерный захват и инкапсуляцию. Доставка МВМ с липидной основой в клетку может быть подтверждена экстракцией клеточных липидов и количественным определением МВМ с помощью обычных способов, известных специалистам, таких как масс-спектрометрия.

Способы идентификации не имеющих липидной основы МВМ включают вышеописанные базовые клеточные способы, в которых не имеющая липидной основы эндогенная молекула экзогенно добавляется к клетке. В предпочтительном варианте воплощения не имеющая липидной основы эндогенная молекула добавляется к клетке таким образом, что уровень имеющей липидную основу эндогенной молекулы в клетке повышается. В одном варианте воплощения, уровень не имеющей липидную основу эндогенной молекулы повышается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше по сравнению с уровнем в контрольных клетках, не подвергавшихся воздействию. Формула и доставка не имеющей липидной основы молекулы в клетку зависит от свойств каждой исследуемой молекулы, но многие способы известны специалистам. Примеры формулы и доставки не имеющих липидной основы молекул, включают, не ограничиваясь, солюбилизацию ко-растворителями, молекулы-переносчики, активный транспорт, полимерный захват или адсорбцию, полимерную прививку, липосомную инкапсуляцию, и композицию с направленными системами доставки. Доставка МВМ с липидной основой в клетку может быть подтверждена экстракцией клеточных липидов и количественным определением МВМ с помощью обычных способов, известных специалистам, таких как масс-спектрометрия.

2. Эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели)

При использовании здесь, “эпиметаболический переключатель” (эпи-переключатель) является молекулой (эндогенной или экзогенной), которая модулирует метаболическое переключение от здорового (или нормального) состояния к болезненному состоянию и наоборот, тем самым поддерживая или восстанавливая здоровье клеток, тканей, систем и/или здоровье человека в целом. Эпи-переключатели способны к эффективной нормализации в тканевой микросреде. Например, эпи-переключатель включает любую молекулу, которая способна, при добавлении или извлечении из клетки, влиять на микросреду (*напр.*, на метаболический статус) клетки. Специалисты поймут, что под эпи-переключателем изобретения также может подразумеваться смесь из двух или более молекул, где смесь характеризуется одной или более из вышеупомянутых функций. Молекулы в смеси представлены в таком соотношении, что смесь действует как эпи-переключатель. Примеры эпи-переключателей включают, не ограничиваясь, coQ-10; витамин D3; ECM компоненты, такие как фибронектин; иммуномодуляторы, такие как TNFa и любые интерлейкины, напр., IL-5, IL-12, IL-23; факторы ангиогенеза и факторы апоптоза.

В некоторых вариантах воплощения, эпи-переключатель является энзимом, таким как энзим, который или прямо принимает участие в катализации одной или более реакций в цикле Кребса, или вырабатывает промежуточные продукты цикла Кребса, избыток которых запускает цикл Кребса. В некоторых вариантах воплощения энзим является энзимом неокислительной фазы пентозофосфатного пути, таким как трансальдолаза или транскетолаза. В других вариантах воплощения энзим является компонентом энзима или энзимного комплекса, который способствует циклу Кребса, таким как синтаза или лигаза. Примеры энзимов включают сукцинил CoA синтазу (энзим цикла Кребса) или пируват карбоксилазу (лигазу, которая катализирует обратимую карбоксилацию пирувата с образованием оксалоацетата (OAA), промежуточного продукта цикла Кребса).

В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель является строительным блоком CoQ10. Строительные блоки CoQ10 включают, не ограничиваясь, фенилаланин, тирозин, 4-гидроксифенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидрокиманделат, ванилиновую кислоту, 4-гидрокибензоат, мевалоновую кислоту, фарнезил, 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон, а также их

соответствующие кислоты или ионы. В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель выбирается из фенилаланина, тирозина, 4-гидроксифенилпирувата, фенилацетата и 4-гидроксибензоата.

В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель является соединением семейства витаминов В. В семейство витаминов В входят, например, рибофлавин (витамин В2) или его аналоги. Эпи-переключатели также включают любые аналоги или неактивные формы лекарства, которые могут превращаться в ходе метаболизма *in vivo* в любые эндогенные МВМ, такие как описанные здесь.

В одном варианте воплощения эпи-переключатель является также МВМ. В одном варианте воплощения эпи-переключатель не является CoQ10. Специалисты в данной области могут обычным образом идентифицировать эпи-переключатели с помощью анализов, подробно описанных в настоящем документе.

(i) Способы идентификации эпи-переключателей

Эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели) являются молекулами, способными модулировать метаболический статус клетки, *напр.*, вызывать метаболическое переключение со здорового (или нормального) состояния на болезненное состояние и наоборот, и тем самым способными поддерживать или восстанавливать здоровье клеток, тканей, органов, систем и/или здоровье человека в целом. Эпи-переключатели изобретения, таким образом, полезны для диагностической оценки болезненного состояния. Кроме того, эпи-переключатели изобретения полезны для терапевтических применений, где применение или введение эпи-переключателя (или модуляция эпи-переключателя другими терапевтическими молекулами) приводит к нормализации клеточной микросреды и болезненного состояния.

Идентификация эпи-метаболического переключателя включает, в общем, установление молекулярного профиля, например, метаболитов, липидов, белков или РНК (их индивидуальные профили или в комбинации) для совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Молекула из профиля(ей), у которой изменение уровня (*напр*, возрастание или уменьшение уровня) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируется как потенцильный эпи-переключатель.

В одном варианте воплощения эпи-переключатель является также МВМ.

Потенциальные эпи-переключатели можно оценить по их способности проникать в клетки путем экзогенного присоединения к клетке при использовании любого количества обычных способов, известных специалистам в данной области, и при использовании любого способа, описанного здесь. Например, проникновение потенциального эпи-переключателя в клетку можно подтвердить экстрацией клеточного содержимого и оценкой количества потенциального эпи-переключателя обычными способами, известными специалистам в данной области, такими как масс-спектрометрия. Потенциальный эпи-переключатель, способный проникать в клетку, тем самым идентифицируется как МВМ.

Для идентификации эпи-переключателя, потенциальный эпи-переключатель затем оценивается по способности переключать метаболический статус клетки. Способность потенциальных эпи-переключателей переключать метаболический статус клеточной микросреды оценивается по вхождению (*напр.* экзогенному присоединению) в клетку потенциального эпи-переключателя и мониторингу в клетке одного или более признаков: изменений экспрессии генов (напр., изменения в мРНК или экспрессии белков), изменений концентрации липидов или уровней метаболитов, изменений уровней биоэнергетичных молекул, изменений клеточной энергетики и/или изменений функции или числа митохондрий. Способность потенциальных эпи-переключателей переключать метаболический статус клеточной микросреды обычно может быть идентифицирована специалистом в данной области при использовании любого из способов, подробно описанных в настоящем документе. Потенциальные эпи-переключатели в дальнейшем оцениваются по способности переключать метаболический статус больной клетки в нормальное здоровое состояние (или напротив, по способности переключать метаболический статус нормальной клетки на состояние болезни). Потенциальный эпи-переключатель, способный перекючать метаболический статус больной клетки в нормальное здоровое состояние (или переключать метаболический статус нормальной клетки на состояние болезни) таким образом идентифицируется как эпи-переключатель. В предпочтительных вариантах воплощения, эпи-переключатель не оказывает негативного влияния на здоровье и/или рост нормальных клеток.

Эпиметаболические переключатели изобретения включают, не ограничиваясь, низкомолекулярные метаболиты, молекулы с липидной основой и

белки и РНК. Для идентификации метаболического переключателя в классе низкомолекулярных эндогенных метаболитов, устанавливаются метаболитные профили совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Метаболитный профиль для каждой клетки или ткани определяется путем экстракции метаболитов из клетки или ткани и последующих идентификации и количественной оценки метаболитов с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, включающих, например, методы жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией или газовой хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией. Метаболиты, у которых изменение уровня (напр., возрастание или уменьшение уровня) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпи-переключатели.

Для идентификации эпи-метаболических переключателей в классе эндогенных молекул, имеющих липидную основу, устанавливаются липидные профили для совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Липидный профиль для каждой клетки или ткани определяется путем экстракции метаболитов из клетки или ткани и последующих идентификации и количественной оценки метаболитов с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, включающих, например, методы жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией или газовой хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией. Липиды, у которых изменение уровня (напр., возрастание или уменьшение уровня основной массы или следов) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпи-переключатели.

Для идентификации эпиметаболических переключателей в классе белков и РНК, устанавливаются профили экспрессии генов для совокупности клеток или тканей, которые показывают различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Профиль экспрессии для каждой клетки или ткани определяется по уровню(ям) мРНК или белка с использованием стандартных протеомических методов, анализа мРНК или геномна, *напр*, подробно описанных в настоящем документе. Гены, у которых возрастание экспрессии (*напр.*, возрастание или

уменьшение экспрессии мРНК или уровня белка) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпи-переключатели.

Когда молекулярные профили, описанные выше, установлены (напр., для растворимых метаболитов, молекул с липидной основой, белков, РНК, или других биологических классов соединений), проводятся анализы клеточных и биохимических путей обмена, для выявления известных связей между идентифицированными потенциальными эпи-переключателями в клеточной микросреде. Эта информация, полученная благодаря таким анализам клеточных и/или биохимических путей обмена, может быть использована для группирования путей обмена и потенциальных эпи-переключателей.

Полезность эпи-переключателя для модулировании болезненного состояния может быть в дальнейшем оценена и подтверждена специалистами с использованием любого из способов, известных специалистам в данной области или подробно описанных в настоящем документе. Полезность эпи-переключателя для модулирования болезенного состояния может быть оценена путем прямой экзогенной доставки эпи-переключателя в клетку или в организм. Полезность эпи-переключателя для модулирования болезеннного состояния может быть альтернативно оценена путем разработки молекул, которые прямо модулируют эпи-переключатель (*напр.*, уровень или активность эпи-переключателя). Полезность эпи-переключателя для модулирования болезеннного состояния может также быть оценена путем разработки молекул, которые непрямо модулируют эпи-переключатель (*напр.*, уровень или активность эпи-переключателя) путем регулирования других молекул, таких как гены (*напр.*, регулируя РНК или уровень белка), включенных в тот же путь синтеза, что и эпи-переключатель.

Эпи-метаболитический подход, описанный здесь, способствует идентификации эндогенных молекул, которые существуют в клеточной микросреде и уровни которых чувствительны и контролируются генетически, мРНК, или основанными на белках механизмах. Обнаруженные в нормальных клетках регуляторные пути, которые запускаются эпи-переключателями настоящего изобретения, могут предоставлять терапевтическую ценность в разрегулированной или болезненной клеточной микросреде. Кроме того, эпи-метаболитический подход, описанный здесь, идентифицирует эпи-переключатели,

которые могут предоставлять диагностический индикатор для использования в клиническом отборе пациентов, в наборах для диагностики болезней или как прогностический индикатор.

III. Анализы, используемые для идентификации МВМ/эпи-переключателей

Приемы и способы настоящего изобретения, предназначенные для выделения и идентификации представляющих интерес молекул и соединений, включают, не ограничиваясь: жидкостную хроматографию (ЖХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), масс-спектрометрию (МС), газовую хроматографию (ГХ), жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию (ЖХ-МС), газовую хроматографию/масс-спектрометрию (ГХ-МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), магнитную резонансную томографию (МРТ), инфракрасную спектрометрию с преобразованием Фурье (ПФ-ИК), и масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Следует понимать, что техники масс-спектрометрии включают, не ограничиваясь, использование магнитных секторов и двухфокусных приборов, трансмиссионных квадрупольных приборов, квадрупольных приборов ионных ловушек, времяпролетных приборов (TOF), приборов ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-MS), и времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS).

Количественное определение уровней биоэнергетических молекул:

Факторы влияния (напр., МВМ или эпи-переключатели) могут быть идентифицированы по изменениям в уровнях клеточных биоэнергетических молекул (*напр.*, АТФ, пирувата, АДФ, НАДН, НАД, НАДФН, НАДФ, ацетилСоА, FADH2) в клетках, к которым применили возможный эпи-переключатель. В типовых методах определения уровней биоэнергетичеких молекул используется колориметрия, флюоресценция и/или биолюминесцентные способы. Примеры таких способов приведены ниже.

Уровни АТФ внутри клетки могут быть оценены при помощи различных способов и систем, известных специалистам в данной области. Например, в одной системе цитоплазматическая АТФ, вышедшая из лизированных клеток, реагирует с люциферином и энзимом люциферазой, выделяя свет. Эта биолюминесценция

подсчитывается на биолюминометре, и таким образом можно подсчитать концентрацию внутриклеточной АТФ (набор для анализа АТФ EnzyLight™ (EATP-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния). В другой системе, например, и АТФ, и ее дефосфорилированная форма, АДФ, подсчитываются с помощью биолюминесценции; после того как уровни АТФ подсчитаны, АДФ трансформируется в АТФ и затем определяется и подсчитывается с использованием той же люциферазной системы (набор для анализа отношения АДФ/АТФ ApoSENSOR™, BioVision Inc., Mountain View, Калифорния).

Пируват является важным промежуточным продуктом в клеточных путях обмена. Пируват может превращаться в углевод путем глюконеогенеза, превращаться в жирную кислоту или усваиваться при посредстве ацетил CoA, или превращаться в аланин или этанол, в зависимости от метаболического статуса клетки. Таким образом, определение уровней пирувата дает подсчет метаболичекой активности и статус клеточного образца. Один способ для определения пирувата, например, использует как колориметрию, так и флюорометрию для определения концентраций пирувата в различных диапазонах (набор для анализа пирувата EnzyChrom™ (Cat# EPYR-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния).

Факторы влияния (напр., MBM или эпи-переключатели) могут влиять на процесс окислительного фосфорилирования, проходящий в митохондриях клеток, которые задействованы в образовании и поддержании биоэнергетических молекул в клетках. Кроме способов определения изменений в клеточной энергетике непосредственно в клеточных культурах и образцах (описанных выше), существуют способы, определяющие и подсчитывающие действия компонентов дискретных энзимов и комплексов митохондрий в клетках. Например, анализ полной активности OXPHOS MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон) может определять и подсчитывать действия соединений, примененных непосредственно к комплексам I-V, выделенным из митохондрий. Способы определения и подсчета действий индивидуальных митохондриальных комплексов, таких как НАДН дегидрогеназа (Комплекс I), цитохром с оксидаза (Комплекс IV) и АТФ синтаза (Комплекс V) также доступны (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Оценка клеточной энергетики:

Факторы влияния (напр., MBM или эпи-переключатели) могут также быть идентифицированы по изменениям в клеточной энергетике. Один пример оценки клеточной энергетики – оценка в реальном времени потребления молекулярного кислорода и/или изменений в pH среды клеточной культуры. Например, способность потенциального эпи-переключателя модулировать метаболический статус клетки может быть анализирована с использованием, например, XF24 Анализатора (Seahorse, Inc.). Эта технология позволяет в реальном времени определить изменение кислорода и pH в монослое клеток для того, чтобы оценить биоэнергетику клеточной микросреды. XF24 Анализатор подсчитывает и сравнивает показатель потребления кислорода (OCR), который является оценкой аэробного метаболизма и внеклеточного окисления (ECAR), который является оценкой гликолиза, и оба служат индикаторами клеточной энергетики.

Оценка окислительного фосфорилирования и митохондриальной функции

Окислительное фосфорилирование – это процесс, путем которого АТФ образуется при окислении питательных соединений, осуществляющийся у эукариот благодаря белковым комплексам, встроенным в мембраны митохондрий. Поскольку окислительное фосфорилирование является основным источником АТФ в клетках большинства организмов, изменения активности окислительного фосфорилирования могут сильно видоизменить метаболизм и энергетический баланс в клетке. В некоторых вариантах воплощения изобретения факторы влияния (напр., MBM или эпи-переключатели) могут определяться и/или идентифицироваться благодаря своему действию на окислительное фосфорилирование. В некоторых вариантах воплощения факторы влияния (напр., MBM или эпи-переключатели) могут определяться и/или идентифицироваться благодаря своему действию на специфические аспекты окислительного фосфорилирования, включая, не ограничиваясь, цепь транспорта электронов и синтез АТФ.

Встроенные в мембрану белковые комплексы митохондрий, которые осуществляют процессы, участвующие в окислительном фосфорилировании, выполняют специфические задачи и имеют номера I, II, III и IV. Эти комплексы, вместе с проходящей сквозь мембрану АТФ-синтазой (также известной как Комплекс V), являются ключевыми единицами, участвующими в процессах окислительного фосфорилирования. В дополнение к анализам, которые могут

определить действия факторов влияния (напр., MBM или эпи-переключателей) на функцию митохондрий в общем и процессы окислительного фосфорилирования в частности, существуют анализы, которые можно использовать для определения действий эпи-перключателей на отдельный комплекс, выделенный из остальных комплексов.

Комплекс I, также известный как НАДН-коэнзим Q оксидоредуктаза или НАДХ дегидрогеназа, является первым белком в цепи транспорта электронов. В некоторых вариантах воплощения, можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на образование НАД+ Комплексом I. Например, комплекс может быть извлечен методом иммунного захвата из образца в 96-луночный планшет; окисление НАДН в $НАД^+$ происходит одновременно с восстановлением молекулы красителя, у которой коэффициэнт поглощения возрастает на 450 нМ (набор для микропланшетного анализа активности фермента комплекса I, MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Комплекс IV, также известный как цитохором с оксидаза (ЦО), является последним белком в цепи транспорта электронов. В некоторых вариантах воплощения можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на окисление цитохрома с и восстановление кислорода до воды Комплексом IV. Например, ЦО можно извлечь путем иммуносорбции в микролуночный планшет и оценить окисление ЦО с помощью колориметрического анализа (набор для микропланшетного анализа активности фермента комплекса IV, MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Последним ферментом в процессе окислительного фосфорилирования является АТФ-синтаза (Комплекс V), которая использует протонный градиент, созданный другими комплексами, для синтеза АТФ из АДФ. В некоторых вариантах воплощения можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на активность АТФ. Например, активность и количество АТФ-синтазы в образце также можно оценить по АТФ-синтазе, которую извлекают путем иммуносорбции в микролуночный планшет. Фермент при определенных условиях может функционировать также как АТФ-аза , таким образом в этом анализе активности АТФ-синтазы степень, в которой АТФ редуцируется до АДФ, оценивается по определению одновременного окисления НАДН до НАД+. Количество АТФ подсчитывается с использованием меченного антитела к АТФ-

азе (набор для микропланшетного двойного анализа АТФ-синтазы (активность + количество), MitoSciences Inc., Eugene, Орегон). Дополнительные анализы окислительного фосфорилирования включают анализы, которые определяют действие на активность Комплексов II и III. Например, система полного OXPHOS MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон) может использоваться для оценки действия соединения на Комплексы II и III, а также Комплексы I, IV и V, для предоставления данных о действии соединения на всю систему окислительного фосфорилирования.

Как замечено выше, наблюдение в реальном времени образцов интактных клеток может быть проведено с использованием проб на изменение содержания кислорода и pH в клеточной культуральной среде. Эти анализы клеточной энергетики дают широкое представление о митохондриальной функции и действиях потенциальных факторов влияния (*напр.,* MBM или эпи-переключателей) на активность митохондрий в клетках образца.

Факторы влияния (*напр.,* MBM или эпи-переключатели) могут также действовать на митохондриальную проницаемость (MPT), явление, заключающееся в том, что проницаемость митохондриальных мембран возрастает вследствие образования митохондриальных проницаемых транзитных пор (MPTP). Возрастание митохондриальной проницаемости может приводить к разбуханию митохондрий, неспособности осуществлять окислительное фосфорилирование с образованием АТФ и к гибели клетки. MPT может участвовать в индукции апоптозов (см., например, Halestrap, A.P., Biochem. Soc. Trans. 34:232-237 (2006) и Lena, A. *et al.* JouPHKl of Translational Med. 7:13-26 (2009), полное описание которого включено в настоящую заявку путем ссылки).

В некоторых вариантах воплощения осуществляются детекция и количественный подсчет действия фактора влияния (напр., MBM или эпи-переключателя) на образование, прекращение и/или действие MPT и MPTP. Например, аналитические исследования могут определить MPT благодаря использованию специальных молекул красителя (кальцеина), локализующихся во внутренней мембране митохондрий и других клеточных структур. Использование другой молекулы, $CoCl_2$, служит для подавления флюоресценции красителя кальцеина в цитозоле. $CoCl_2$, однако, не может иметь доступ внутрь митохондрий, таким образом флюоресценция в митохондриях не подавляется, пока не

появляется МРТ и $CoCl_2$ не получает возможность попадать внутрь митохондрий благодаря МРТР. Потеря митохондриально-специфичного флюоресцентного сигнала говорит о наличии МРТ. Проточная цитометрия может быть использована для оценки флюоресценции в клетках и органеллах (набор для анализа переходных пор MitoProbe™, Molecular Probes, Eugene, Орегон). В дополнительных анализах используется флюоресцентный микроскоп для оценки экспериментальных результатов (набор для анализа митохондриальных переходных пор Image-iT™ LIVE, Molecular Probes, Eugene, Орегон).

Измерение клеточной пролиферации и воспалительной реакции

В некоторых вариантах воплощения изобретения, факторы влияния (напр., МВМ или эпи-переключатели) могут быть идентифицированы и оценены по их действию на образование или активность молекул, связанных с клеточной пролиферацией и/или воспалительной реакции. Эти молекулы включают, не ограничиваясь, цитокины, факторы роста, гормоны, компоненты внеклеточного матрикса, хемокины, нейропептиды, нейротрансмиттеры, нейротрофины и другие молекулы, участвующие в клеточном сигналинге, а также внутриклеточные молекулы, такие как те, которые участвуют в сигнальной трансдукции.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является фактором роста с потенциальными ангиогенезными, васкулогенными и митогенными свойствами.VEGF стимулирует проницаемость и разбухание эндотелия, и действие VEGF связано с многочисленными болезнями и расстройствами, включая ревматоидные артриты, метастазирующий рак, возрастную дегенерацию макулы и диабетическую ретинопатию.

В некоторых вариантах воплощения изобретения фактор влияния (напр., МВМ или эпи-переключатель) может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию на образование VEGF. Например, клетки, существующие в условиях гипоксии или имитации ацидоза будут показывать возрастание VEGF образования. VEGF, выделяемый в среду, может быть исследован с использованием ELISA или других основанных на антителах анализах, с использованием имеющихся в продаже анти-VEGF антител (R&D Systems, Minneapolis, Миннесота). В некоторых вариантах воплощения изобретения эпи-переключатель может быть идентифицирован и и/или описан на основе его действия(й) на реакцию клеток на VEGF и/или на основе его действия(й) на

экспрессию или активность VEGF рецептора.

Фактор некроза опухолей (TNF), задействованный как в работе здоровой иммунной системы, так и при аутоиммунных болезнях, является ключевым медиатором при воспалении и активности иммунной системы. В некоторых вариантах воплощения изобретения эпи-переключатель может быть идентифицирован и характеризован по его влиянию на образование или активность TNF. Например, TNF, образующийся в культивируемых клетках и секретируемый в среду, может быть подсчитан с использованием иммуноферментного твердофазного анализа и других основанных на антителах способах, известных специалистам. Кроме того, в некоторых вариантах воплощения фактор влияния может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию(ям) на экспрессию рецептора к (Human TNF RI Duoset, R&D Systems, Minneapolis, Миннесота).

Компоненты внеклеточного матрикса (ECM) играют роль как в структуре клеток и тканей, так и в процессах сигналинга. Например, латентный трансформирующий фактор роста бета связывается с белками, являющиеся компонентами ECM, что создает резервуар трансформирующего фактора роста бета(TGFβ) внутри ECM. Матрикс-связывающий TGFβ может высвобождаться во время процессов трансформации матрикса и может влиять на действие фактора роста на близлежащие клетки (Dallas, S. Methods in Mol. Biol. 139:231-243 (2000)).

В некоторых вариантах воплощения фактор влияния (напр., MBM или эпи-переключатель) может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию на образование ECM в культивируемых клетках. У исследователей есть полноценные технологии, благодаря которым можно исследовать и количественно определить образование ECM в клетках, а также состав ECM. Например, синтез ECM в клетках можно оценить, внедряя клетки в гидрогель перед инкубацией. Биохимические и другие анализы проводились на ECM, образованном клетками после сбора клеток и расщепления в гидрогеле (Strehin, I. и Elisseeff, J. Methods in Mol. Bio. 522:349-362 (2009)).

В некоторых вариантах воплощения может быть идентифицировано или охарактеризовано действие фактора влияния (напр., MBM или эпи-переключателя) на образование, наличие или отсутствие ECM или одного из его компонентов в организме. Разработаны техники для получения мышей с заданным нокаутом

генов, которые позволяют нокаутировтаь определенные ECM гены только в отдельных типах клеток или на определенных стадиях развития (Brancaccio, M. *et al*. Methods in Mol Bio. 522:15-50 (2009)). Таким образом можно оценить действие применения или введения эпи-переключателя или потенциального эпи-переключателя на активность или отсутствие определенных ECM компонентов в определенных тканях на определенных стадиях развития.

Измерение целостности плазматической мембраны и гибели клеток

Факторы влияния (напр., MBM или эпи-переключатели) могут быть идентифицированы по изменениям целостности плазматической мембраны в клеточном образце и/или по изменениям числа или проницаемости клеток, которые подвержены апоптозам, некрозам или клеточным изменениям, которые демонстрируют повышенную или пониженную вероятность гибели клеток.

Анализ лактатдегидрогеназы (LDH) может дать оценку клеточного статуса и уровней повреждения. LDH является стабильным и сравнительно обильным цитоплазматическим ферментом. Когда плазматическая мембрана теряет физическую целостность, LDH выходит в межклеточное пространство. Более высокие концентрации LDH коррелируют с более высокими уровнями повреждения плазматической мембраны и гибели клеток. Примеры анализов LDH включают анализы, которые используют колориметрическую систему для определения и количественного подсчета уровней LDH в образце, а восстановленная форма тетразоловой соли образуется при активности фермента LDH (набор лактат-дегидрогеназы QuantiChrom™ (DLDH-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния; набор определения цитотоксичности LDH, Clontech, Mountain View, Калифорния).

Апоптоз – это процесс программируемой гибели клеток, который может начинаться с множества различных событий. Изменения скорости и/или числа клеток, которые подверглись апоптозам, можно определять с помощью различных анализов. Одним типом анализа, который используется для детекции и количественного определения апоптозов, является каспазный анализ. Каспазы – это цистеинпротеназы, специфичные для аспаргиновой кислоты, которые активируются при протеолитическом расщеплении во время апоптоза. Примеры анализов, которые определяют активированные каспазы, включают аналитические системы PhiPhiLux® (OncoImmunin, Inc., Gaithersburg, Мэриленд) и Caspase-Glo®

3/7 (Promega Corp., Madison, Висконсин). Дополнительные анализы, которые могут определить апоптозы и изменения процента или числа клеток, подвергшихся апоптозу в сравниваемых образцах, включают TUNEL/ДНК фрагментационные анализы. Эти анализы определяют от 180 до 200 пар оснований ДНК фрагментов, образовавшихся в ядре во время фазы апоптоза. Примеры TUNEL/ДНК фрагментационных анализов включают набор для определения гибели клеток in situ (Roche Applied Science, Indianapolis, Индиана) и TUNEL колориметрические и флюорометрические системы DeadEnd™ (Promega Corp., Madison, Висконсин).

Некоторые апоптозные анализы детектируют и делают количественную оценку белков, связанных с апоптозами и/или неапоптозным состоянием. Например, мультиплексный анализ цитотоксичности MultiTox-Fluor (Promega Corp., Madison, Висконсин) использует один субстрат, флюоресцентную систему для детекции и подсчета протеаз, специфичных для живых и мертвых клеток, тем самым оценивая отношение живых клеток и клеток, подвергшихся апоптозу, в образце клеток или тканей.

В продаже имеются дополнительные способы детекции и количественной оценки апоптозов, которые включают анализы, определяющие клеточную проницаемость (*напр.*, анализ апоптоза APOPercentage™, Biocolor, Великобритания) и анализы для Annexin V (*напр.*, набор для определения апоптоза Annexin V-Biotin, BioVision Inc., Mountain View, Калифорния).

IV. Лечение онкологических заболеваний

В настоящем изобретении представлены способы лечения или профилактики онкологического заболевания у человека, включая введение фактора влияния человеку в количестве, достаточном для лечения или профилактики онкологического заолевания, тем самым леча или предотвращая онкологическое заболевание. В одном варианте воплощения фактор влияния не является CoQ10.

При использовании здесь, "онкологическое заболевание" относится ко всем типам рака или неоплазмы или злокачественных опухолей, находимых у людей, включащих, не ограничиваясь, лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и

саркомы.

Используемые здесь термины или словосочетания “онкологическое заболевание”, "рак", "неоплазма" и "опухоль" используются взаимозаменяемо и или в единственной, или во множественной форме относятся к клеткам, которые подверглись злокачественной трансформации, которая сделала их паталогичными для организма носителя. Первичные раковые клетки (то есть клетки, близкие к злокачественной трансформации) можно легко отличить от нераковых клеток с помощью хорошо известных техник, в частности при гистологичеком исследовании. Определение раковой клетки, используемое здесь, включает не только первичные раковые клетки, но также стволовые раковые клетки, а кроме того предраковые клетки или любые клетки, образовавшиеся от предшественника раковой клетки. Это включает метастазировавшие раковые клетки, и культуры in vitro и клеточные линии, образовавшиеся от раковых клеток. Если речь идет о типе рака, который обычно проявляется как солидная опухоль, "клинически определяемая" опухоль является опухолью, которая определяется на основании массы опухоли, напр, с помощью таких процедур, как компьютерная томография, МР-томография, рентген, ультразвуковое обследование или пальпация, и/или которая определяется на основании экспрессии одного или более ракоспецифичных антигенов в образце, взятом от пациента.

Термин "саркома" в общем относится к опухоли, которая состоит из субстанции, подобной эмбриональной соединительной ткани, и как правило состоит из тесно лежащих клеток в фибриллярной или гомогенной субстанции. Примеры сарком, которые можно лечить фактором влияния настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь, хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Эйбмети, злокачественную липому, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амеобластосаркому, ботриоидную саркому, хлорому, хориокарциному, эмбриональную саркому, саркому опухоли Вильмса, эндометриальную саркому, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластическую саркому, злокачественную остеобластокластому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную геморрагическую саркому, иммунобластическую саркому В-клеток, лимфому, иммунобластическую саркому Т-клеток, саркому Йенсена, саркому Капоши,

саркому клеток Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезензимому саркому, паростальную саркому, ретикулоцитную саркому, саркому Рауса, сероцитозную саркому, синовиальную саркому и телеангиэктактическую саркому.

Термин "меланома" употребляется для обозначения опухоли, образующейся из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить факторами влияния изобретения, включают, не ограничиваясь, например, акральную ленгтигинозную меланому, амеланотическую меланому, эпителиоидный невус, меланому Клаудмана, меланому S91, меланому Гардинга-Пасси, ювенильную меланому, предраковый меланоз, злокачественную меланому, узловатую меланому, субунгалную меланому и поверхностную распространенную меланому.

Термин "карцинома" относится к злокачественным новообразованиям, состоящим из эпителиальных клеток, которые имеют тенденцию проникать в окружающие ткани и образовывать метастазы. Карциномы, которые можно лечить факторами влияния настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь, например, ацинарную карциному, ацинозную карциному, аденокистозную карциному, железисто-кистозную карциному, карциному аденоматозум, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярно-клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базоцеллюлярную карциному, базальную карциному, плоскоклеточную базальную карциному, бронхиоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, медуллярную карциному, холангиогенную карциному, хорионкарциному, коллоидную карциному, комедокарциному, карциному тела матки, решетчатую карциному, карциному плевры, карциному кожи, цилиндрическую карциному, карциному цилиндрических клеток, протоковую карциному, твердую карциному, эмбриональную карциному, круглоклеточную карциному, эпиермоидную карциному, эпителиальную карциному аденоидов, экзофитную карциному, рак из язвы, карциному фиброзум, перстневидно-клеточную карциному, слизеобразующую карциному, гигантоклеточную карциному, железистую карциному, гранулезоклеточную карциному, пиломатрикс карцинома, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному клеток Гюртле, гиалиновую карциному, гипернефроидную карциному,

инфантильную эмбриональную карциному, карциному in situ, интраэпидермальную карциному, интраэпителиальную карциному, карциному Кромпехера, карциному клеток Кульчитского, крупноклеточную карциному, карциному хрусталика, хрусталиковую карциному, липоматозную карциному, лимфоэпителиальную карциному, медуллярную карциному, мозговидную карциному, меланотическую карциному, мягкую карциному, мукоидную карциному, карциному муципарум, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, карциному мукозум, слизистую карциному, карциному миксоматодес, носоглоточную карциному, овсяно-клеточную карциному, карциному оссификанс, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, карциному шиловидных клеток, слизеобразующую карциному, почечноклеточную карциному, карциному резервных клеток, саркомоподобную карциному, шнейдериановскую карциному, фиброзную карциному, карциному скроти, перстневидноклеточную карциному, недифференцированную карциному, мелкоклеточную карциному, соланоид карциному, карциному сферических клеток, веретоноклеточную карциному, губчатую карциному, плоскоклеточную карциному, стринг карциному, карциному телангиектатикум, карциному телангиектодес, переходно-клеточную карциному, карциному туберозум, туберозную карциному, бородавчатую карциному и карциному виллозум.

Как правило, фактор влияния может быть использован для профилактического или терапевтического лечения любой неоплазмы. В одном варианте воплощения факторы влияния настоящего изобретения используются для лечения солидных опухолей. В различных вариантах воплощения изобретения фактор влияния (напр., CoQ10) используется для лечения различных типов рака кожи (*напр.*, плоскоклеточной карциномы или базальноклеточной карциномы), рака печени, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака простаты, рака печени или рака костей. В одном варианте воплощения фактор влияния, напр., CoQ10, используется для лечения онкологического заболевания кожи, включающего, не ограничиваясь, плоскоклеточные карциномы (включая SCCIS (in situ) и более агрессивные плоскоклеточные карциномы), базальноклеточные карциномы (включая поверхностные, узелковые и инфильтратные базальноклеточные карциномы), меланомы и актинические кератозы. Однако

лечение использованием фактора влияния не ограничивается вышеперечисленными типами рака. Примеры раков, поддающихся лечению фактором влияния, включают, не ограничиваясь, рак мозга, головы и шеи, простаты, молочной железы, семенников, поджелудочной железы, печени, кишечника, мочевого пузыря, почек, легких, немелкоклеточный рак легких, меланому, мезотелиому, рак матки, шейки матки, яичников, саркому, рак костей, желудка и медуллобластому.

Дополнительные примеры раков, которые можно лечить фактором влияния настоящего изобретения, включают, например, болезнь Ходжкина, неходжскинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак молочной железы, рак яичника, рак легких, рабдомиосаркома, первичный тромбоцитоз, первичная макроглобулинемия, мелкоклеточные легочные опухоли, первичные опухоли мозга, рак желудка, рак кишечника, злокачественную инсуланому поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предраковые повреждения кожи, рак семенников, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественную гиперкалцемию, рак шейки матки, рак эндометрия, рак коры надпочечников и рак простаты. В одном варианте воплощения онкологическое заболевание или рак, который можно лечить фактором влияния, *напр.*, CoQ10, не является меланомой.

Настоящее изобретение кроме того предоставляет способы лечения или профилактики онкологического заболевания у людей, включающие выявление людей, подверженных онкологическому заболеванию, и введение вышеупомянутым людям терапевтически эффективного количества фактора-B, способного блокировать анаэробное использование глюкозы и усиливать митохондриальное окислительное фосфорилирование, тем самым леча или предотвращая онкологическое заболевание.

Следует понимать, что определение раковой клетки, используемое здесь, включает раковую клетку, которая вырабатывает энергию путем анаэробного гликолиза (напр., гликолиза, за которым следует ферментация молочной кислоты в цитозоле), аэробный гликолиз или митохондриальное окислительное фосфорилирование (напр., гликолиз, за которым следует окисление пирувата в митохондриях), или комбинацию анаэробного гликолиза и аэробного гликолиза. В

одном варианте воплощения раковая клетка вырабатывает энергию преимущественно путем анаэробного гликолиза (*напр.*, не менее 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более энергии клетки вырабатывается путем анаэробного гликолиза). В одном варианте воплощения, раковая клетка вырабатывает энергию преимущественно путем аэробного гликолиза (*напр.*, не менее 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более энергии клетки вырабатывается путем аэробного гликолиза). Следует также понимать, что определение раковой клетки, используемое здесь, включает популяцию раковых клеток или смесь раковых клеток, включающее клетки, которые вырабатывают энергию путем анаэробного гликолиза и клетки, которые вырабатывают энергию путем аэробного гликолиза. В одном варианте воплощения, популяция раковых клеток включает преимущественно клетки, которые вырабатывают энергию путем анаэробного гликолиза (*напр.*, не менее 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более клеток в популяции вырабатывают энергию путем анаэробного гликолиза). В одном варианте воплощения, популяция раковых клеток включает преимущественно клетки, которые вырабатывают энергию путем аэробного гликолиза (*напр.*, не менее 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более клеток в популяции).

Используемое здесь словосочетание “анаэробное использование глюкозы” или “анаэробный гликолиз” или “гликолизный путь обмена” относится к клеточному вырабатыванию энергии путем гликолиза, следующего после молочнокислой ферментации в цитозоле. Например, многие раковые клетки вырабатывают энергию путем анаэробного гликолиза.

Используемое здесь словосочетание “аэробный гликолиз” или “митохондриальное окислительное фосфорилирование” относится к клеточному вырабатыванию энергии путем гликолиза, следующего после окисления пирувата в митохондриях.

Используемая здесь фраза “может блокировать анаэробное использование глюкозы и усиливать митохондриальное окислительное фосфорилирование” или “переключать с гликолизного пути обмена на митохондриальное окислительное фосфорилирование” относится к способности фактора влияния (*напр.*., эпиметаболического переключателя) вызывать переключение или изменение в метаболическом статусе клетки от анаэробного гликолиза к аэробному гликолизу или митохондриальному окислительному фосфорилированию. При использовании

здесь, “переключение (с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование)” относится к снижению энергетической зависимости от гликолизного пути обмена, предпочтительно к уровню, наблюдаемому в нормальных клетках. Абсолютный уровень митохондриального окислительного фосфорилирования также может уменьшаться или снижаться, но предпочтительно в сочетании с повышением эффективности митохондриального окислительного фосфорилирования.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, онкологическое заболевание, подвергающееся лечению, не является заболеванием, которое обычно лечится местным введением с ожиданием системной доставки активного агента в терапевтически эффективных уровнях. При использовании здесь, фраза “не является заболеванием, которое обычно лечится местным введением” относится к онкологическим заболеваниям, которые не лечатся обычно или стандартно терапевтическим агентом посредством местного введения, но обычно лечатся терапевтическим агентом посредством, например, внутривенного введения. Онкологические заболевания, обычно не лечащиеся посредством местного введения, включают, не ограничиваясь, рак молочной железы, рак простаты, рак печени, рак поджелудочной железы и рак костей.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения или профилактики агрессивного онкологического заболевания у людей, включающий введение фактора влияния человеку в выбранной более низкой дозе, чем в дозах, используемых или выбираемых для менее агрессивных или неагрессивных онкологических заболеваний, тем самым леча или предотвращая агрессивное онкологическое заболевание. В связанном аспекте изобретения представлен способ лечения или профилактики неагрессивного онкологического заболевания у человека, включающего введение фактора влияния человеку в выбранной более высокой дозе, чем в дозах, используемых или выбираемых для агрессивных онкологических заболеваний, тем самым леча или предотвращая неагрессивное онкологическое заболевание.

Используемый здесь термин “агрессивное онкологическое заболевание” относится к онкологическому заболеванию, включающему быстро растущую опухоль. Агрессивное онкологическое заболевание обычно не реагирует или плохо реагирует на терапевтическое лечение. Примеры агрессивных

онкологических заболеваний включают, не ограничиваясь, карциному поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, саркому Юинга, метастазирующий рак молочной железы, метастазирующую меланому, рак мозга (астроцитома, глиобластома), андроген-независимый рак простаты, рак яичников и нехожкинскую лимфому.

При использовании здесь, термин "неагрессивное онкологическое заболевание" относится к онкологическому заболеванию, включающему медленно растущую опухоль. Неагрессивное онкологическое заболевание обычно хорошо или средне реагирует на терапевтическое лечение. Примеры неагрессивных онкологических заболеваний включают, не ограничиваясь, неметастазирующий рак груди, андроген-зависимый рак простаты, мелкоклеточный рак легких и острую лимфоцитную лейкемию. В одном варианте воплощения неагрессивные онкологические заболевания включают любое онкологическое заболевание, которое не является агрессивным онкологическим заболеванием.

Выбранная более низкая дозировка CoQ10 для лечения агрессивных онкологических заболеваний должна включать дозы ниже, чем в дозовом режиме, который обычно используется или выбирается для менее агрессивных или неагрессивных онкологических заболеваний. В различных вариантах воплощения выбранная более низкая доза CoQ10, которая около 1,5 раз, около 2 раз, около 3 раз, около 4 раз, около 5 раз или около 10 раз ниже, чем в дозовом режиме, который обычно используется или выбирается для менее агрессивных или неагрессивных онкологических заболеваний. Следует понимать, что выбранная более низкая дозировка CoQ10 включает также более короткое время лечения (*напр.*, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз более короткое время лечения) CoQ10 или менее частое введение (*напр.*, наполовину менее частое, в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз или 24 раза менее частое) CoQ10 по сравнению с временем лечения или протоколами введения, используемыми или выбранными для менее агрессивных или неагрессивных онкологических заболеваний. В различных вариантах воплощения, выбранная более низкая дозировка коэнзима Q10 для лечения агрессивных онкологических заболеваний включает от около 0,0001 до около 5,0, от около 0,001 до около 1,0, от около 0,001 до около 0,5, от около 0,001 до около 0,4, от около 0,001 до около 0,30 , от около 0,001 до около 0,25, от около 0,001 до 0,20, от около 0,001 до около 0,12, или от около 0,001 до

около 0,09 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В других вариантах воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,0001, 0,001, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49 или 0,5 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что интервалы, для которых любое из этих значений выше или ниже границ, также рассматриваются как часть этого изобретения, *напр.*, от около 0,005 до около 0,09 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

Выбранная более высокая дозировка CoQ10 для лечения неагрессивных онкологических заболеваний должна включать дозы выше, чем в дозовом режиме, который обычно используется или выбирается для агрессивных онкологических заболеваний. В различных вариантах воплощения изобретения, выбранная более высокая доза CoQ10 в около 1,5 раза, около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз или около 10 раз выше, чем в дозовом режиме, который обычно используется или выбирается для агрессивных онкологических заболеваний. Следует понимать, что выбранная более высокая дозировка CoQ10 включает также более продолжительное время лечения (*напр.*, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз более продолжительное время лечения) CoQ10 или более частое введение (*напр.*, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз или 24 раза более частое) CoQ10 по сравнению со временем лечения или протоколом введения, обычно используемым или выбранным для агрессивных онкологических заболеваний. В различных вариантах воплощения, выбранная более высокая дозировка коэнзима Q10 для лечения агрессивного онкологического заболевания включает от около 0,001 до около 10,0, от около 0,005 до около 10,0, от около 0,01 до около 10,0, от около 0,05 до около 5,0, от около 0,05 до около 2,0, от около 0,05 до около 1,0, от около 0,05 до около 0,7, от около 0,10 до около 0,50, или от около 0,12 до 0,5 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В других вариантах воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,001, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг,, 0,8 мг,, 0,9 мг или 1,0 мг CoQ10 на

квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что что интервалы, для которых любое из этих значений выше или ниже границ, также рассматриваются как часть этого изобретения, *напр.*, от около 0,15 до около 0,5 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

В одном варианте воплощения, фактор влияния настоящего изобретения уменьшает размер опухоли, ингибирует рост опухоли и/или продлевает время выживания субъекта, имеющего опухоль. Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения опухолей у людей или других животных путем введения таким людям или животным эффективного, нетоксичного количества фактора влияния. Специалист в данной области сможет, путем обычного эксперимента определить, какое эффективное, нетоксичное количество фактора влияния требуется для целей лечения злокачественных опухолей. Например, терапевтически активное количество фактора влияния может варьировать в соответствии с такими факторами, как стадия болезни (напр., стадия I по сравнению со стадией IV), возрастом, полом, медицинскими проблемами (напр., иммуноподавляющие условия или болезни) и весом пациента, и способностью фактора влияния вызывать желаемую реакцию у пациента. Дозовый режим может быть отрегулирован для получения оптимальной терапевтической реакции. Например, несколько раздельных доз могут вводиться ежедневно, или доза может быть пропорционально уменьшена, если это показано при острой необходимости терапевтической ситуации.

V. Терапевтические мишени при онкологических заболеваниях

В настоящем изобретении представлены способы идентификации терапевтических мишеней при онкологических заболеваниях. В изобретении также представлены терапевтические мишени, идентифицированные такими способами. Идентификация терапевтической цели включает, в общем, экзогенное применение фактора-В или возможного фактора-В на клетку или группу клеточных линий, и последующую оценку изменений, вызванных в подвергшейся воздействию клетке по сравнению с контрольной клетокой, не подвергавшейся воздействию. Вызванные клеточные изменения, которые прослеживаются, включают, не ограничиваясь, изменения морфологии, физиологии или состава, напр., уровня РНК, белков, жиров или метаболитов, в

клетке. Вызванные клеточные изменения как результат воздействия возможного фактора-В можно проследить с использованием любого из анализов, описанных в настоящем документе. Например, изменения экспрессии генов по уровню мРНК можно оценить по методу ПЦР в режиме реального времени, в котором изменения в экспрессии генов, влияющие на уровень белка, можно проследить с использованием антительных микропанелей и 2-D гель-электрофореза. Гены, идентифицированные как модулированные возможным факторов-В (*напр.*, по мРНК и/или уровню белка) затем оценивались по перспективе системной биологии с использованием анализа метаболизма (программа Ingenuity IPA) и при изучении известной литературы. Гены, идентифицированные как потенциальные терапевтические мишени, затем проходили подтверждающий анализ, такой как иммуноблоттинг, нокаут миРНК или рекомбинантные методы, основанные на выработке и характеристике белка. Затем для идентификации модуляторов мишеней можно использовать скрининговые анализы. Модуляторы терапевтических мишеней полезны как новые терапевтические агенты для онкологических заболеваний. Модуляторы терапевтических мишеней можно обычным образом идентифицировать с использованием скрининговых анализов, детально описанных в настоящем документе, или с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

Гены, идентифицированные здесь как модулированные (*напр.*, положительно или отрицательно модулированные, по мРНК или уровню белка) посредством МВМ/эпи-переключателя, CoQ10, являются мишенями для лекарства изобретения. Мишени для лекарства изобретения включают, не ограничиваясь, гены, перечисленные здесь ниже в таблицах 1-28. Основанные на результатах экспериментов, описанных здесь в приложениях, ключевые белки, модулированные Q10, связаны с или могут быть классифицированы по различным путям обмена или группам молекул, включая факторы транскрипции, апоптозный ответ, пентозофосфатный путь, путь биосинтеза, окислительный стресс (про-окиданты), мембранные перестройки и метаболизм окислительного фосфорилирования. На основании полученных здесь результатов ключевыми белками, модулируемыми CoQ10, являются следующие. Ключевой белок, модулируемый CoQ10 и являющийся трансприпционным фактором, - HNF4альфа. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с апоптозным

ответом, включают Bcl-xl, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, и cMyc. Ключевой белок, модулируемый CoQ10 и связанный с пентозофосфатным путем, является трансальдолазой 1. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с путями биосинтеза, включают COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазу и 4-гидроксибензоат. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с окислительным стрессом (про-оксиданты) включают нейтрофильный цитоплазматический фактор 2, синтазу оксида азота 2A и супероксиддисмутазу 2 (митохондриальную). Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с метаболизмом окислительного фосфорилирования, вкючают Цитохром c, комплекс I, комплекс II, комплекс III и комплекс IV. Другие ключевые белки, которые прямо или опосредованно модулируются CoQ10, включают Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и CamКиназу II.

Соответственно, в одном варианте воплощения изобретения, мишени лекарственного средства могут включать HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансальдолазу 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазу, 4-гидробензоазу, нейтрофильный цитоплазматический фактор 2, синтазу оксида азота 2A и супероксиддисмутазу 2, VDAC, Bax channel, ANT, Цитохром c, комплекс I, комплекс II, комплекс III, комплекс IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназу II. В предпочитаемых вариантах воплощения, мишени лекарственного средства могут включать HNF4A, трансальдолазу, NM23 и BSCv. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является TNF4A. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является трансальдолаза. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является NM23. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является BSCv. Скринирующие анализы, полезные для идентификации модуляторов или идентификации мишеней лекарственных средств, описаны ниже.

VI. Скрининговые анализы

В настоящем изобретении также представлены способы (также называемые здесь «скрининговые анализы») идентификации модуляторов, *т.е.,* кандидатов или тестируемых соединений или агентов (*напр.,* белков, пептидов,

пептидомиметиков, пептоидов, маленьких молекул или других веществ), которые модулируют экпрессию и/или активность идентифицированной терапевтической мишени изобретения. Такие анализы обычно включают в себя реакцию между терапевтической мишенью изобретения и одним или более исследуемым соединением. Другие соединения сами могут быть или тестируемыми соединениями, или комбинацией тестируемых компонентов и веществ, естественно связывающихся с маркером изобретения. Соединения, идентифицированные посредством анализов, таких как описанные здесь, могут быть полезны, например, для лечения или профилактики онкологического заболевания.

Исследуемые соединения, используемые в скрининговых анализах настоящего изобретения, могут быть получены из любого доступного источника, включая систематические библиотеки природных и/или синтетических соединений. Исследуемые соединения также могут быть получены путем любого из многочисленных подходов в комбинированных библиотечных способах, известных специалистам, включая: биологические библиотеки; пептоидные библиотеки (библиотеки молекул, имеющих функциональность пептидов, но с новым, не пептидным каркасом, устойчивым к ферментному расщеплению, но тем не менее остающимся биоактивным; см, *напр.,* Zuckermann *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-85); территориально доступные параллельные библиотеки твердой фазы или растворимой фазы; синтетические библиотечные способы, требующие деконволюции; библиотечные способы; и синтетические библиотечные способы, использующие аффинную хроматографию. Подходы биологической библиотеки и пептоидной библиотеки ограничены пептидными библиотеками, в то время как другие четыре подхода пригодны для библиотек пептидов, непептидных олигомеров или низкомолекулярных соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Примеры способов для синтеза молекулярных библиотек можно найти в специальной литературе: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad.* Sci. *USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; и in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Библиотеки соединений могут быть представлены в растворах (*напр.*, Houghten, 1992, *Biotechniques* 13:412-421), или в частицах (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), бактериях и/или спорах, (Ladner, USP 5,223,409), плазмидах (Cull *et al*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) или фагах (Scott и Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla *et al,* 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner, *supra.*).

Скрининговые способы настоящего изобретения включают в себя контакт клеток с исследуемым соединением и определение способности исследуемого соединения модулировать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения в клетке. Экспрессия и/или активность терапевтической мишени изобретения может быть определена, как описано в настоящем документе. Экспрессия и/или активность терапевтической мишени изобретения может также быть определена с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности повышать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности повышать экспрессию и/или активность терапевтической мишени, выбранной из белков, перечисленных в таблицах 1-28, где терапевтическая мишень положительно модулируется CoQ10 (*напр.*, показывает положительное кратное изменение). В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности понижать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности понижать экспрессию и/или активность терапевтической мишени, выбранной из белков, перечисленных в таблицах 1-28, где терапевтическая мишень отрицательно модулируется CoQ10 (*напр.*, показывает отрицательное кратное изменение).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения представлены способы скринирования возможных или тестируемых соединений, которые являются субтсратами терапевтических мишеней изобретения или их биологически активных составляющих. В еще одном варианте воплощения изобретения представлены способы скринирования возможных или тестируемых соединений, которые связываются с терапевтическими мишенями изобретения

или их биологически активными составляющими. Определение способности тестируемого вещества прямо связываться с терапевтической мишенью может быть проведено при соединении вещества с радиоизотопной или энзимной меткой таким образом, что такое связывание соединения с терапевтической мишенью можно определить, детектируя меченное маркером соединение в комплексе. Например, соединения (*напр.,* маркер к субстрату) можно пометить ^{131}I, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, или ^{3}H, прямо или опосредованно, и радиоактивный изотоп будет детектирован или прямым подсчетом радиоэмиссии, или подсчетом сцинцилляции. Альтернативно, соединения способа могут быть энзимно помечены, например, пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой или люциферазой, и энзимная метка детектируется путем определения превращения соответствующего субстрата в продукт.

Это изобретение также относится к новым агентам, идентифицированным по вышеописанным способам скринирования. Соответственно, в объеме этого изобретения для дальнейшего использования находится агент, идентифицированный как описано здесь в соответствующей модели на животных. Например, агент, способный модулировать экспрессию и/или активность маркера изобретения, идентифицированный как описано здесь, может быть использован в модели на животных для определения эффективности, токсичности или побочных эффектов воздействия такого агента. Альтернативно, агент, идентифицированный как описано здесь, может быть использован в модели на животных для определения механизма действия такого агента. Кроме того, это изобретение относится к использованию новых агентов, идентифицированным по вышеописанным способам скринирования, для лечения, как описано выше.

VII. Фармацевтические композиции и фармацевтическое введение

Факторы влияния изобретения могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту. Типично, фармацевтическая композиция содержит фактор влияния изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании здесь "фармацевтически приемлемый носитель" включает все без исключения растворы, диспергентные среды, покрытия, антибактериальные и антигрибковые агенты, изотонический и абсорбирующий агенты и подобные тому физиологически совместимые. Примеры

фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько из воды, солевого раствора, фосфатного буферного солевого раствора, декстрозы, глицерина, этанола и подобных соединений, а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительным включить в состав изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут также включать в минорных количествах вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие реагенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность фактора влияния.

Композиции настоящего изобретения могут быть в различных формах. Они включают, например, жидкости, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (напр., инъецируемые и вливаемые растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, кремы, лосьоны, жидкие мази, мази или пасты, капли для введения в глаза, уши или нос, липосомы и суппозитории. Предпочитаемая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

Факторы влияния настоящего изобретения могут вводиться различными способами, известными специалистам в данной области. Для многих терапевтических применений, предпочитаемым путем/способом введения является подкожная инъекция, внутривенная инъекция или вливание. Как поймут специалисты в данной области, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах воплощения, активное соединение может быть приготовлено с носителем, который защитит соединение от быстрого высвобождения, таким как рецептура контролируемого высвобождения, включающая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биодеградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы для приготовления таких рецептур запатентованы или в основном известны специалистам в данной области. См., напр., Системы доставки лекарств с непрерывным и контролируемым высвобождением, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. В одном варианте воплощения способ введения является парэнтеральным (напр.,

внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным, внутримышечным). В одном варианте воплощения фактор влияния вводится путем внутривенного вливания или инъекции. В другом варианте воплощения фактор влияния вводится путем внутримышечной или подкожной инъекции. В предпочтительном варианте воплощения фактор влияния вводится местно.

Терапевтические композиции типично должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть по рецептуре раствором, микроэмульсией, дисперсией, липосомой или другой упорядоченной структурой, подходящей для высокой концентрации лекарства. Стерильные инъецируемые растворы могут быть приготовлены путем включения активного компонента (напр., фактора влияния) в требуемое количество подходящего раствора с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как требуется, с последующим фильтрованием и стерилизацией. Как правило, дисперсии приготавливаются путем включения активного компонента в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных лиофилизованных порошков для приготовления стерильных инъецируемых растворов предпочитаемыми способами приготовления являются вакуумная сушка и распылительная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, предварительно стерелизованного и профильтрованного. Необходимая текучесть раствора может быть достигнута, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием нужного размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбсция инъецируемых композиций может быть достигнута включением в композицию реагента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Техники и рецептуры в основном можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remmington, Meade Publishing Co., Easton, Пенсильвания. Для системного введения предпочтительна инъекция, включая внутримышечную, внутривенную, внутрибрюшинную и подкожную. Композиции для инъекции могут быть сделаны по рецептуре в жидких растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка или раствор Рингера. Кроме того, соединения могут быть изготовлены в

твердой форме и растворены или превращены в суспензию непосредственно перед использованием. Также включаются лиофилизированные формы.

Фармацевтические композиции для орального введения могут иметь форму, например, таблеток или капсул, приготовленных стандартными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как связывающие реагенты (напр., желатинированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (напр., лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазочные вещества (напр., стеарат магния, тальк или окись кремния); разрыхлители (напр., картофельный крахмал или натрия гликолят крахмала); или увлажняющие реагенты (напр., лауретсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты по способам, хорошо известным специалистам в данной области. Жидкие препараты для орального введения могут иметь форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для соединения с водой или другим подходящим носителем перед использованием. Такие жидкие препараты могут быть приготовлены обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие реагенты (напр., сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (напр., лецитин или гуммиарабик); безводные носители (напр., атионд масло, жирные эфиры, этиловый спирт или ректифицированные растительные масла); и консерванты (напр., метил или пропил-п-гидроксибензоаты или сорбиновая кислота). Препараты могут также при необходимости содержать буферные соли, ароматизаторы, подкрашивающие и подслащивающие вещества.

Препараты для орального введения могут быть разработаны так, чтобы обеспечить контролируемое высвобождение активного компонента. Для введения через рот композиции могут иметь форму таблеток или лепешек, изготовленных стандартным образом. Для введения путем ингаляции соединения для использования в соответствии с настоящим изобретением легко доставляются в форме аэрозольного спрея, подающегося из баллона под давлением или небулайзера, с использованием подходящей сжатой жидкости, напр., дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозольного баллона под

давлением дозированная единица может быть точно определена, если обеспечить доставку клапаном постоянного количества. Капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторе или инжекторе могут быть разработаны с содержанием порошка смеси компонентов и подходящей порошковой базы. такой как лактоза или крахмал.

Соединения могут быть изготовлены для парэнтерального введения путем инъекции, напр., путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Рецептуры для инъекции могут быть представлены в лекарственной форме со стандартной дозировкой, напр., в ампулах или мультидозных емкостях, с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в жировых или водных носителях, и могут содержать рецептурные реагенты, такие как суспензирующие, стабилизирующие и/или дисперсирующие реагенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть в форме порошка для соединения с подходящим носителем, напр., стерильной апирогенной водой, перед использованием.

Соединения могут быть также изготовлены в ректальной композиции, такой как суппозитории или удерживающие клизмы, напр., содержащие традиционную суппозиторную основу, такую как кокосовое масло или другие глицериды.

В дополнение к композициям, описанным выше, соединения могут также быть изготовлены как депо препарата. Такие долгодействующие композиции могут вводиться имплантацией (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, в композиции могут входить подходящие полимерные или гидрофобные вещества (например, как эмульсия в соответствующем масле) или ионообменные смолы, или в виде слабо растворимых производных, например, как слабо растворимая соль.

Системное введение может также быть трансмукозальным или трансдермальным. Для трансмукозального или трансдермального введения в рецептуре используются пенетранты, пригодные для преодоления барьера. Такие пенетранты в большинстве своем известны специалистам и включают, например, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты, для облегчения проникновения могут быть использованы детергенты. Трансмукозальное введение может быть произведено с использованием назальных спреев или суппозиториев.

Для местного введения, соединение(я) изобретения смешиваются в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, известных в большинстве своем специалистам. Местно может быть использован водный раствор для лечения повреждений или воспаления для ускорения исцеления.

Композиции могут, при желании, быть представлены в виде упаковки или диспенсера, который может содержать одну или более дозовых единиц в форме, содержащей активный ингредиент. Упаковка, может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистер. К упаковке или диспенсеру могут прилагаться инструкции по применению.

Для терапии, включающей введение нуклеиновых кислот, соединение(я) изобретения могут быть изготовлены во множестве форм введения, включая системное и местное введение. Техники и рецептуры в большинстве своем можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remmington, Meade Publishing Co., Easton, Пенсильвания. Для системного введения предпочтительна инъекция, включая внутримышечную, внутривенную, внутрибрюшинную, внутриузловую и подкожную. Для инъекции соединения(й) изобретения могут быть изготовлены в жидких растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка и раствор Рингера. Кроме того, соединение(я) могут быть изготовлены в твердой форме и растворены или превращены в суспензию непосредственно перед использованием. Также включаются лиофилизированные формы.

В одном варианте воплощения, композиции, содержащие фактор влияния, вводятся местно. Предпочтительно представлять активный ингредиент, т.е. фактор-В, как фармацевтическую композицию. Активного ингредиента может содержаться, для местного введения, от около 0,001% до около 20% от массы, по весу композиции в конечном продукте, хотя он может составлять до 30% от массы, предпочтительно от около 1% до около 20% от массы композиции . Местные композиции настоящего изобретения содержат активный ингредиент вместе с одним или более приемлемым ностелем(ями), а также опционально любой другой терапевтический ингредиент(ы). Носитель(и) должен быть «приемлемым» в отношении того, что должен сочетаться с другими ингредиентами композиции и не причинять вред реципиенту.

При лечении пациента, у которого выявлена соответствующая болезнь,

вводится терапевтически эффективное количество агента или агентов. Терапевтически эффективная доза означает такое количество соединения, которое приводит к облегчению симптомов или удлинению срока жизни пациента.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений должна определяться стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или экспериментальных животных, напр., определением $ЛД_{50}$ (дозы, летальной для 50% популяции) и $ЭД_{50}$ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение между токсичным и терапевтическим эффектами называется терапевтическим индексом и может быть выражено как соотношение $ЛД_{50}/ЭД_{50}$. Предпочтительны соединения, которые показывают высокие терапевтические индексы. Данные, полученные из таких клеточных исследований и исследований на животных, могут быть использованы в разработке диапазона дозировки для использования у людей. Дозировка таких соединений находится предпочтительно внутри диапазона циркулирующих концентраций, которые включают $ЭД_{50}$ с маленькой или отсутствующей токсичностью. Дозировка может варьировать внутри этого диапазона в зависимости от применяемой формы дозы и используемого способа введения.

Для любого соединения, используемого в способе изобретения, терапевтически эффективная доза может быть установлена непосредственно из исследований клеточной культуры. Например, доза может быть разработана в моделях на животных для достижения циркулирующей концентрации в плазме в диапазоне, который включает IC_{50}, как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезной дозы для людей. Уровни в плазме могут быть подсчитаны, например, при помощи ВЭЖХ.

Точная композиция, путь введения и дозировка могут быть выбраны отдельным врачом с учетом состояния пациента. (см. напр. Fingl et al., Фармакологическая основа терапии, 1975, гл. 1 с. 1). Следует заметить, что внимательный медик будет знать, как и когда следует остановить, прервать или отрегулировать введение, приводящее к токсичности или к дисфункции органа. И наоборот, внимательный врач также будет знать, как отрегулировать лечение к более высоким уровням, если клинический ответ не адекватен (не допуская токсичность). Размер вводимой дозы при лечении соответствующего

паталогического расстройства будет варьировать в соответствии с серьезностью состояния, подвергающегося лечению, и способа введения. Серьезность состояния может, например, быть оценена, частично, путем стандартных прогностических способов оценки. Более того, доза и, возможно, частота дозы, также будет варьировать в зависимости от возраста, веса тела и реакции отдельного пациента. Программа, сопоставимая с обсуждаемой выше, может быть использована в ветеринарной медицине.

В зависимости от определенных состояний, подвергаемых лечению, соответствующие агенты могут быть созданы и введены системно или местно. Техники для разработки формулы и введения можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, 18^{e} изд.., Mack Publishing Co., Easton, Пенсильвания. (1990). Подходящие способы введения могут включать оральное, ректальное, трансдермальное, вагинальное, трансмукозальное или кишечное введение; парентеральную доставу, включая внутримышечные, подкожные, костномозговые инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутрибрюшинные, интраназальные или внутриглазные инъекции, перечислено лишь несколько способов.

Композиции, описанные выше, могут вводиться субъекту в любой подходящей рецептуре. В дополнение к лечению онкологического заболевания местными композициями CoQ10, в других аспектах изобретения CoQ10 может быть доставлен другими способами. Например, CoQ10 может быть разработан для парентеральной доставки, напр., для подкожной, внутривенной, внутримышечной или внутриопухолевой инъекции. Могут использоваться другие способы доставки, например, липосомная доставка или диффузия из прибора, наполненного композицией. Композиции могут вводиться одним болюсом, множественными инъекциями или непрерывной инфузией (например, внутривенно или путем перитонеального диализа). Для парентерального введения, композиции предпочтительно разрабатываются в стерильной апирогенной форме. Композиции настоящего изобретения также могут вводиться in vitro в клетку (например, для вызова апоптозов в раковой клетке в культуре in vitro) непосредственным добавлением композиции к жидкости, в которой содержится клетка.

В зависимости от определенных состояний, подвергаемых лечению, соответствующие агенты могут быть созданы и введены системно или местно.

Техники для разработки формулы и введения можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, 18^{e} изд., Mack Publishing Co., Easton, Пенсильвания. (1990). Подходящие способы введения могут включать оральное, ректальное, трансдермальное, вагинальное, трансмукозальное или кишечное введение; парентеральную доставу, включая внутримышечные, подкожные, костномозговые инъции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутрибрюшинные, интраназальные или внутриглазные инъекции, перечислено лишь несколько способов.

Для инъекции агенты изобретения могут быть разработаны в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для такого трансмукозального введения в рецептуре используются пенетранты, пригодные для преодоления барьера. Такие пенетранты в большинстве своем известны специалистам в данной области.

Использование фармацевтически пригодных носителей в рецептуре соединений, раскрытых здесь для практики изобретения, в дозах, пригодных для системного введения, входит в объем изобретения. С правильным выбором носителя и подходящей технологией производства, композиции настоящего изобретения, в частности, разработанные как растворы, могут вводиться парентерально, например, путем внутривенной инъекции. Могут быть легко разработаны композиции с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных специалистам, в дозах, подходящих для орального введения. Такие носители дают возможность композициям изобретения быть изготовленными в виде таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и тому подобного, для орального введения пациенту, подвергаемому лечению.

Агенты, предназначенные для внутриклеточного введения, могут вводиться с использованием техник, хорошо известных специалистам, имеющим стандартные знания в данной области. Например, такие агенты могут быть инкапсулированы в липосомы, затем введены, как описано выше. Липосомы являются сферичесими липидными двухслойными структурами с водным содержимым. Все молекулы, представленные в водном растворе во время образования липосомы, включены в водную среду. Содержимое липосом

защищено от внешней микросреды и, поскольку липосомы проникают сквозь клеточные мембраны, эффективно доставляется в цитоплазму клеток. Кроме того, вследствие своей гидрофобности маленькие органические молекулы могут вводиться прямо внутриклеточно.

Фармацевтические композиции, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в эффективном количестве для достижения соответствующей цели. Определение эффективного количества вполне возможно для специалистов в данной области, особенно в свете детального раскрытия, предоставленного здесь. В дополнение к активным ингредиентам эти фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, содержащие вспомогательные вещества, которые способствуют созданию содержащих активные компоненты препаратов, которые можно использовать в фармацевтике. Препараты, формула которых подходит для орального введения, могут быть в форме таблеток, драже, капсул или растворов. Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть произведены по способу, который сам по себе известен, напр., посредством стардатного смешивания, растворения, грануляции, приготовления драже, процессов возгонки, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

Композиции, подходящие для местного введения, включают жидкости или полужидкие препараты, подходящие для проникновения сквозь кожу в месте, где требуется лечение, такие как жидкие мази, лосьоны, кремы, мази или пасты и капли, подходящие для введения в глаза, уши или нос. Капли в соответствии с настоящим изобретением могут быть в виде стерильных водных или жировых растворов и могут быть приготовлены путем разведения активного ингредиента в подходящем водном растворе бактерицидного и/или фунгицидного реагента и/или любого другого подходящего консерванта, и предпочтительно включать поверхностно-активный реагент. Получившийся в результате раствор затем может быть очищен и стерилизован путем фильтрации и помещен в контейнер по асептичной технологии. Примерами бактерицидных и фунгицидных реагентов, подходящих для включения в капли, являются нитрат или ацетат фенилртути (0,002%), хлорид бензалкония (0,01%) и ацетат хлоргексидина (0,01%). Подходящие растворы для приготовления жирового раствора включают глицерин,

разведенный спирт и пропиленгликоль.

Лосьоны в соответствии с настоящим изобретением включают те, которые подходят для применения для кожи или глаз. Глазной лосьон может содержать стерильный водный раствор, необязательно содержащий бактерицид, который может быть приготовлен по способам, похожим на способы, описанные для приготовления капель. Лосьоны или жидкие мази для применения для кожи могут также включать подсушивающий и охлаждающий кожу реагент, такой как спирт или ацетон, и/или увлажнитель, такой как глицерин или масло, такое как касторовое масло или арахисовое масло.

Кремы, мази или пасты в соответствии с настоящим изобретением являются полутвердыми формулами с активным ингредиентом для наружного применения. Они могут быть сделаны путем смеси активного ингредиента в мелкодисперсной или порошковой форме, отдельно или в растворе или суспензии в водной или неводной жидкости, с воздухом в подходящем механизме, с масляной или немасляной основой. Основа может содержать углеводороды, такие как твердый, мягкий или жидкий парафин, глицерин, пчелиный воск, металлсодержащее мыло; растительный клей; масло природного происхождения, такое как миндальное, кукурузное, арахисовое, касторовое или оливковое масло; шерстяной жир или его производные, или жирные кислоты, такие как стеариновая или олеиновая кислоты вместе со спиртом, таким как пропиленгликоль или макрогели. Композиция может включать любой подходящий поверхностно-активный агент, такие как анионный, катионный или неионизированный поверхностно-активный агент, такие как эфиры сорбита или их полиоксиэтиленовые производные. Также могут быть включены суспендирующие агенты, такие как природные смолы, производные целлюлозы или неорганические вещества, такие как кремний, и другие ингредиенты, такие как ланолин.

Фармацевтические композиции для парэнтерального введения включают водные растворы активных компонентов в растворимой в воде форме. Кроме того, суспензии активных компонентов могут быть приготовлены в виде подходящих для масляных инъекций суспензий. Подходящие липофильные растворы или несущие среды включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Суспензии для водных инъекций могут содержать вещества, которые

повышают вязкость суспензии, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость компонентов, что позволяет проникать раствору в более высокой концентрации.

Фармацевтические препараты для орального использования могут представлять из себя комбинацию активных компонентов с твердыми вспомогательными веществами, необязательно размолотыми, в результате чего получается смесь, и произведенными в виде смеси гранул, после добавления подходящих вспомогательных веществ, при желании, для получения таблеток или драже. Подходящими вспомогательными веществами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании можно добавить дезинтегрирующие агенты, такие как поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соли, такие как альгинат натрия.

Драже производятся в соответствующей оболочке. Для этой целей могут быть использованы концентрированные растворы сахара, которые необязательно могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбопол гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. К оболочке таблеток или драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций или доз активных компонентов.

Фармацевтические препараты, которые можно использовать орально, включают плотно наполненные капсулы, сделанные из желатина, а также мягкие, запечатанные капсулы, сделанные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Плотно наполненные капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителями, такими как лактоза, связующими веществами, такими как крахмал, и/или лубрикантами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные компоненты могут быть растворены или суспендированы в подходящих

жидкостях, таких как жирные кислоты, жидкий парафин или жидкий полиэтиленгликоль. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы.

Композиция при желании может включать буферную систему. Буферные системы выбираются так, чтобы поддерживать или буферезировать pH композиций внутри желаемого диапазона. Термин "буферная система" или "буфер", используемые здесь, означают растворенный реагент или реагенты, которые, находясь в водном растворе, стабилизируют такой раствор, не давая произойти сильным изменениям pH (концентрации ионов водорода или активности) при добавлении к нему кислот или оснований. Растворенный реагент или реагенты, которые таким образом отвечают за устойчивость или изменения pH от стартового значения pH в буфере в диапазоне, указанном выше, хорошо известны. Хотя подходящих буферов существует очень много, предпочитаемым буфером является моногидрат фосфата калия.

Конечное значение pH фармацевтической композиции может варьировать внутри физиологически совместимого диапазона. Обязательно, чтобы конечное значение pH не раздражало кожу человека и предпочтительно, чтобы оно способствовало трансдермальному транспорту активного компонента, т.е. CoQ10. Без нарушения этого условия pH может быть выбрано так, чтобы усилить стабильность соединения CoQ10 и чтобы при необходимости подогнать к нужному состоянию консистенцию. В одном варианте воплощения предпочтительное значение pH от около 3,0 до около 7,4, более предпочтительное от около 3,0 до около 6,5, наиболее предпочтительное от около 3,5 до около 6,0. В композиции предпочтительных местных носителей основным компонетом является вода, обязательно очищенная, напр., деоинизированная вода. Такие носители содержат воду в диапазоне от более чем около 50 до около 95 процентов, на основе общего веса композиции. Конкретное количество присутствующей воды не является критичным, однако оно подгоняется для получения желаемой вязкости (обычно от около 50 спз до около 10000 спз) и/или концентрации других компонентов. Местные носители предпочтительно имеют вязкость не менее около 30 сантипуаз.

Другие известные трансдермальные проникающие в кожу факторы также могут быть использованы для содействия доставки CoQ10. Иллюстрацией являются сульфоксиды, такие как диметилсульфоксид (ДМСО) и подобные ему

вещества; циклические амиды, такие как 1-додецилазациклогептан-2-он (Azone.TM., зарегистрированная торговая марка Nelson Research, Inc.) и подобные ему вещества; амиды, такие как N,N-диметилацетамид (ДМА) N,N-диэтилтолуамид, N,N-диметилформамид, N,N-диметилоктамид, N,N-диметилдекамид, и подобные вещества; производные пирролидона, такие как N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, 2-пирролидон-5-карбоксильная кислота, N-(2-гидроксиэтил)-2-пирролидон или его эфиры жирных кислот, 1-лаурил-4-метоксикарбонил-2-пирролидон, N-талловалкилпирролидоны, и подобные вещества; полиолы, такие как пропиленгликоль, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, дипропиленгликоль, глицерин, гексантриол и подобные вещества; линейные и разветвленные жирные кислоты, такие как олеиновая, линолевая, лауриновая, валериановая, гептановая, капроновая, миристиновая, изовалериановая, неопентановая, триметилгексановая, изостеариновая и подобные вещества; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, октанол, олеиловый, стеариловый, ланолиновый спирты, и подобные вещества; анионные поверхностно-активные вещества, такие как лаурат натрия, натрий лаурилсульфат, и подобные вещества, катионные поверхностно-активные вещества, такие как хлорид бензалколия, хлорид додецилтриметиламмония, бромид цетилтриметиламмония, и подобные вещества; неионные поверхностно-активные вещества, такие как эфиры пропоксилированного полиоксиэтилена, напр, Полоксамер 231, Полоксамер 182, Полоксамер184, и подобные вещества, этоксилированные жирные кислоты, напр., Tween 20, Myjr 45, и подобные вещества, производные сорбитана, напр., Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 60, и подобные вещества, этоксилирированные спирты, напр., полиоксиэтилена (4) лауиловый эфир (Brij 30), полиоксиэтилена (2) олеиловый эфир (Brij 93), и подобные вещества, лецитин и производные лецитина, и подобные вещества; терпены, такие как D-лимонен, α-пинен, β-карен, α-терпинеол, карвол, карвон, ментон, оксид лимонена, оксид α-пинена, эвкалиптовое масло и подобные вещества. Также подходят в качестве проникающих сквозь кожу факторов органические кислоты и эфиры, такие как салициловая кислота, метилсалицилат, лимонная кислота, янтарная кислота и подобные вещества.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения представлены композиции, содержащие CoQ10, и способы их приготовления. Предпочтительно,

композиции содержат, по меньшей мере, от около 1% до около 25% CoQ10 (весовые проценты). CoQ10 можно приобрести у Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japan) как УБИДЕКАРЕНОН (USP). CoQ10 также можно приобрести у Kaneka Q10 как Kaneka Q10 (USP УБИДЕКАРЕНОН) в порошковой форме (Pasadena, Texas, USA). CoQ10, использованный в способах, приведенных здесь, имеет следующие характеристики: остаточные растворители соответствуют требованию USP 467; содержание воды менее чем 0,0%, менее чем 0,05% или менее чем 0,2%; остаток после прокаливания 0,0%, менее чем 0,05%, или менее чем 0,2% ; содержание тяжелых металлов менее чем 0,002%, или менее чем 0,001%; чистота между 98-100% или 99,9%, или 99,5%. Способы приготовления композиций предоставлены в разделе примеров ниже.

В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляются способы для лечения или профилактики онкологического заболевания у людей местным введением коэнизма Q10 людям, таким образом чтобы оказать лечебное или профилактическое действие, где человеку вводится местная доза коэнзима Q10 с местным наполнителем, где коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,01 до около 0,5 миллиграммов коэнзима Q10 на квадратный сантиметр кожи. В одном варианте воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,09 до около 0,15 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В различных вариантах воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,001 до около 5,0, от около 0,005 до около 1,0, от около 0,005 до около 0,5, от около 0,01 до около 0,5, от около 0,025 до около 0,5, от около 0,05 до около 0,4, от около 0,05 до около 0,30 , от около 0,10 до около 0,25, или от около 0,10 до 0,20 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В других вариантах воплощения, коэним Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49 или 0,5 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В одном варианте воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,12 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, *напр.*, от около 0,03 до около

0,12, от около 0,05 до около 0,15, от около 0,1 до около 0,20, или от около 0,32 до около 0,49 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

В другом варианте воплощения изобретения, коэнзим Q10 вводится в форме крема CoQ10 в дозе между 0,5 и 10 миллиграммами крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи, где крем CoQ10 содержит между 1 и 5% коэнзима Q10. В одном варианте воплощения, крем CoQ10 содержит около 3% коэнзима Q10. В других вариантах воплощения, крем CoQ10 содержит около 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5% коэнзима Q10. В различных вариантах воплощения, крем CoQ10 вводится в дозе около 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10 миллиграмм крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, *напр.*, между около 0,5 и около 5,0, около 1,5 и 2,5, или около 2,5 и 5,5 мг крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

В другом варианте воплощения коэнзим Q10 вводится в форме крема CoQ10 в дозе между 3 и 5 миллиграммами крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи, где крем CoQ10 содержит между 1 и 5% коэнзима Q10. В одном варианте воплощения крем CoQ10 содержит около 3% коэнзима Q10. В других вариантах воплощения крем CoQ10 содержит около 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5% коэнзима Q10. В различных вариантах воплощения, крем CoQ10 вводится в дозе около 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 миллиграмм крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, *напр.*, между около 3.0 и около 4,0, около 3,3 и 5,3, или около 4,5 и 4,9 мг крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

Некоторые аспекты изобретения предоставляют способы для лечения или профилактики онкологического заболевания у людей путем местного введения коэнзима Q10, так чтобы имели место лечение или профилактика, где коэнзим Q10 местно применяется один или несколько раз за 24 часа в течение шести недель или более.

Некоторые аспекты изобретения предоставляют способ для приготовления 3% крема коэнзима Q10, который включает этапы приготовления Фаз A, B, C, D и

E и комбинацию всех фаз, такую как формирование масло-в-воде эмульсии 3% CoQ10 крема.

В некоторых вариантах воплощения, ингредиенты фазы A включают алкил C_{12-15} бензоат NF 4,00 % (по весу), цетиловый спирт 2,00 % (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5 % (по весу) и стеариловый спирт NF 1,50 % (по весу), тогда как ингредиенты фазы B включают диэтиленгликоль моноэфир NF 5,00 % (по весу), глицерин USP 2,00 % (по весу), пропиленгликоль USP 1,50 % (по весу), феноксиэтанол NF 0,475 % (по весу), очищенную воду USP 16,725 % (по весу) и дисперсию карбомера 2% 40,00 % (по весу), и ингредиенты фазы C включают молочную кислоту USP 0,50 % (по весу), раствор лактата натрия USP 2,00 % (по весу), троламин NF 1,30 % (по весу), и очищенную воду USP 2,50 % (по весу). Кроме того, в этих воплощениях ингредиенты фазы D включают диоксид титана USP 1,00 % (по весу), а ингредиенты фазы E включают CoQ10 21% концентрат 15% (по весу).

В некоторых других вариантах воплощения, ингредиенты фазы A включают каприновый/каприлиновый триглицерид 4,00 % (по весу), цетиловый спирт 2,00 % (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5 % (по весу) и стеариловый спирт NF 1,50 % (по весу), тогда как ингредиенты фазы B включают диэтиленгликоля моноэфир NF 5,0 % (по весу), глицерин USP 2,00 % (по весу), пропиленгликоль USP 1,50 % (по весу), феноксиэтанол NF 0,475 % (по весу), очищенную воду USP 16,725 % (по весу) и дисперсию карбомера 2% 40,00 % (по весу), и ингредиенты фазы C включают молочную кислоту USP 0,50 % (по весу), раствор лактата натрия USP 2,00 % (по весу), троламин NF 1,30 % (по весу), и очищенную воду USP 2,50 % (по весу). Кроме того, в этих воплощениях ингредиенты фазы D включают диоксид титана USP 1,00 % (по весу), а ингредиенты фазы E включают CoQ10 21% концентрат 15% (по весу).

В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляются способы приготовления 3% крема коэнзима Q10, которые включают этапы (1) добавления ингредиентов фазы A в соответствующую емкость и нагрев до 70-80 градусов C на водяной бане; (2) добавление ингредиентов фазы B, за исключением дисперсии карбомера, в соответствующую емкость и смешение для образования смешанной фазы B; (3) помещение ингредиентов фазы E в соответствующую емкость и расплавление их при 50-60 градусах C на водяной бане для образования

расплавленной фазы; (4) добавление дисперсии карбомера к емкости со сместью и нагрев до 70-80 градусов С с одновременным перемешиванием; (5) добавление смешанной фазы В к емкости со смесью, с поддержанием температуры на уровне 70-80 градусов С; (6) добавление ингредиентов фазы С к емкости со сместью, с поддержанием температуры на уровне 70-80 градусов С; (7) добавление ингредиентов фазы D к емкости со смесью и последующее перемешивание и гомогенизирование содержимого емкости; затем (8) остановка гомогенизации и охлаждение содержимого емкости до 50-60 градусов С; затем (9) прекращение перемешивания и добавление расплавленной фазы Е к емкости со сместью для образования дисперсии; (10) постоянное перемешивание до тех пор, пока дисперсия не станет ровной и однородной; затем (11) охлаждение содержимого емкости со смесью до 45-50 градусов С.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 3% крем CoQ10. Крем включает фазу А, имеющую C_{12-15} алкилбензоат 4,00 % по весу в композиции, цетиловый спирт 2,00 % по весу в композиции, стеариловый спирт 1,5 % по весу, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,5 % по весу; фазу В, имеющую глицерин 2,00 % по весу, пропиленгликоль 1,5 % по весу, этоксидигликоль 5,0 % по весу, феноксиэтанол 0,475 % по весу, дисперсию карбомера 40,00% по весу, очищенную воду 16,725 % по весу; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,300 % по весу, молочную кислоту 0,500 % по весу, раствор лактата натрия 2,000 % по весу, воду 2,5 % по весу; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000 % по весу; и фазу Е, имеющую CoQ10 21% концентрации 15,000 % по весу. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения, предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 3% крем CoQ10. Крем включает фазу А, имеющую каприновый/каприлиновый триглицерид 4,00 % по весу в композиции, цетиловый спирт 2,00 % по весу в композиции, стеариловый спирт 1,5 % по весу, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,5 % по весу; фазу В, имеющую глицерин 2,00 % по весу, пропиленгликоль 1,5 % по весу, этоксидигликоль 5,0 % по весу, феноксиэтанол 0,475 % по весу, дисперсию карбомера 40,00 % по весу, очищенную воду 16,725 % по весу; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,300 % по весу, молочную кислоту 0,500 % по весу, раствор лактата натрия 2,000 % по весу,

воду 2,5 % по весу; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000 % по весу; и фазу E, имеющую CoQ10 21% концентрации 15,000 % по весу. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 1,5% крем CoQ10. Крем включает фазу A, имеющую C_{12-15} алкилбензоат 5,000 % по весу в композиции, цетиловый спирт 2,00 % по весу в композиции, стеариловый спирт 1,5 % по весу, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,500 % по весу; фазу B, имеющую глицерин 2,000 % по весу, пропилен 1,750 % по весу, этоксидигликоль 5,000 % по весу, феноксиэтанол 0,463 % по весу, дисперсию карбомера 50,00 % по весу, очищенную воду 11,377% по весу; фазу C, имеющую триэтаноламид 1,300 % по весу, молочную кислоту 0,400% по весу, раствор лактата натрия 2,000% по весу, и воду 4,210% по весу; фазу D, имеющую диоксид титана 1,00 % по весу; и фазу E, имеющую CoQ10 21% концентрации 1,500% по весу.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 1,5% крем CoQ10. Крем включает фазу A, имеющую каприновый/каприлиновый триглицерид 5,000% по весу в композиции, цетиловый спирт 2,000 % по весу в композиции, стеариловый спирт 1,50 % по весу, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,500 % по весу; фазу B, имеющую глицерин 2,000% по весу, пропилен 1,750 % по весу, этоксидигликоль 5,000 % по весу, феноксиэтанол 0,463 % по весу, дисперсию карбомера 50,00 % по весу, очищенную воду 11,377% по весу; фазу C, имеющую триэтаноламид 1,3% по весу, молочную кислоту 0,400% по весу, раствор лактата натрия 2,000% по весу, и воду 4,210 % по весу; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000% по весу; и фазу E, имеющую CoQ10 21% концентрации 1,500% по весу. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940.

1. Комбинированная терапия

В некоторых вариантах воплощения, фактор влияния изобретения и/или содержащие его фармацевтические композиции могут использоваться в комбинированной терапии с по крайней мере одним другим терапевтическим

агентом, который может быть другим фактором влияния и/или содержащей его фармацевтической композицией. Фактор влияния и/или содержащая его фармацевтическая композиция и другой терапевтический агент могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергически. В одном варианте воплощения фактор влияния и/или содержащая его фармацевтическая композиция вводится одновременно с введением другого терапевтического агента. В другом варианте воплощения, смесь и/или содержащая ее фармацевтическая композиция вводится до или после введения другого терапевтического агента.

В одном варианте воплощения терапевтические способы изобретения включают дополнительные агенты. Например, в одном варианте воплощения дополнительный агент для использования в терапевтических способах изобретения является хемотерапевтическим агентом.

Хемотерапевтические агенты обычно принадлежат к различным классам, включая, например: 1. ингибиторы топоизомеразы II (цитотоксичные антибиотики), такие как антрациклины/антраценедины, напр., доксорубицин, эпирубицин, идарубицин и неморубицин, антрахиноны, напр., митоксантрон и лозоксантрон, и подофиллотоксины, напр., этопозид и тенипозид; 2. Агенты, которые влияют на образование микротрубочек (ингибиторы митоза), такие как растительные алкалоиды (напр., соединения, принадлежащие к семейству алкалинов, азот-содержащих молекул, получаемых из растений и являющихся биологически активными и цитотоксичными), напр., таксаны, напр., паклитаксел и доцетаксел, и алкалоиды барвинка (Vinca rosea), напр., винбластин, винкритин и винорелбин, и производные подофиллотоксина; 3. Алкилирующие реагенты, такие как азотистый иприт, смеси этиленэмина, алкилсульфонаты и другие соединения с алкильным действием, такие как нитрозомочевина, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид и мелфалан; 4. Антиметаболиты (ингибиторы нуклеозидов), например, фолаты, напр., фолиевая кислота, фторпиримидины, аналоги пуринов или пиримидинов, такие как 5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин, метокрексат и эдатрексат; 5. Ингибиторы топоизомеразы I, такие как топотекан, иринотекан и 9-нитрокамптотецин, и производные камптотецина; и 6. Соединения платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин. Приведенные в качестве примера хемотерапевтические агенты для использования в способах изобретения включают, не ограничиваясь, амифозин (этиол), цисплатин, дакарбазин (DTIC),

дактиномицин, мехлорметамин (азотистый иприт), стрептозоцин, циклофосфамид, каррнустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубицин (адриамицин), доксорубицин липо (доксил), гемцитабин (гемзар), даунорубицин, даунорубицин липо (дауноксом), прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил (5-FU), винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), алдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, камптотецин, CPT-I 1 , lO-гидрокси-7-этил-камптотецин (SN38), дакарбазин, S-I капецитабин, фторафур, 5'дезоксифторуридин, UFT, энилурацил, дезоксицитидин, 5-азацитозин, 5-азадеоксицитозин, аллопуринол, 2-хлороаденозин, триметрексат, аминоптерин, метилен-10-деазааминоптерин (MDAM), оксаплатин, пикоплатин, тетраплатин, сатраплатин, платинум-DACH, или маплатин, CI-973, JM-216, и их аналоги, эпирубицин, этопозида фосфат, 9-аминокамптотецин, 10, 11-метилендиоксикамптотецин, каренитецин, 9-нитрокамптотецин, TAS 103, виндезин, L-фенилаланина иприт, ифосфамидмефосфамид, перфосфамид, трофосфамида кармустин, семустин, эпотилоны A-E, томудекс, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, амсакрин, этопозида фосфат, каренитецин, ацикловир, валацикловир, ганцикловир, амантадин, римантадин, ламивудин, зидовудин, бевацизумаб, трастузумаб, ритуксимаб, 5-фторурацил, Капецитабин, Пентостатин, Триметрексат, Кладрибин, флоксуридин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, идарубицин, месна, иринотекан, митоксантрон, топотекан, леопролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пегаспаргас, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепа, урамустин, винорелбин, хлорамбуцил, цисплан, доксорубицин, паклитаксел (таксол) и блеомицин, и их комбинации, которые очевидны специалистам, основываясь на соответствующем стандарте лечения определенной опухоли или рака.

В другом варианте воплощения дополнительный агент для использования в комбинированной терапии изобретения является биологическим агентом.

Биологические агенты (также называемые биопрепаратами) являются продуктами биологической системы, напр., организма, клетки или рекомбинантной системы. Примеры таких биологических агентов включают молекулы нуклеиновых кислот (напр., антисмысловые молекулы нуклеиновых

кислот), интерфероны, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, антитела, напр., моноклональные антитела, анти-ангиогенные агенты и цитокины. Примеры биологических агентов более детально обсуждаются ниже и в массе своей принадлежат к различным классам, включая, например: 1. Гормоны, гормональные аналоги и гормональные комплексы, напр., эстрогены и аналоги эстрогенов, прогестерон, аналоги прогестерона и прогестины, андрогены, адренокортикостероиды, антиэстрогены, антиандрогены, антитестостероны, ингибиторы стероида надпочечников и антилютеинизирующие гормоны; и 2. Ферменты, белки, пептиды, поликлональные и/или моноклональные антитела, такие как интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы и т.д.

В одном варианте воплощения биопродуктом является интерферон. Интерфероны (IFN) являются типом биологичеких агентов и естественным образом присутствуют в организме. Интерфероны также производятся в лабораторных условиях и их дают пациентам с раком при биологической терапии. Показано, что они улучшают действие иммунной системы пациентов с раком против раковых клеток.

Интерфероны могут работать прямо в раковых клетках, замедляя их рост, или же могут быть причиной изменения раковых клеток в клетки с более нормальным поведением. Некоторые интерфероны также могут стимулировать естественные киллерные (NK) клетки, Т-клетки и макрофаги, которые являются типами белых кровяных телец в кровотоке, помогающими бороться с раковыми клетками.

В одном варианте воплощения биопродукт является интерлейкином. Интерлейкины (IL) стимулируют рост и активность многих иммунных клеток. Они являются белками (цитокинами и хемокинами), которые естественным образом присутствуют в организме, но также могут быть сделаны в лабораторных условиях.

Некоторые интерлейкины стимулируют рост и активность иммунных клеток, таких как лимфоциты, которые работают на разрушение раковых клеток.

В другом варианте воплощения, биопродукт является колониестимулирующим фактором.

Колониестимулирующие факторы (CSF) являются белками, которые дают пациентам для того, чтобы стволовые клетки в костном мозге вырабатывали

больше кровяных клеток. Организм постоянно нуждается в новых белых кровяных клетках, красных кровяных клетках и тромбоцитах, особенно если имеется рак. CSF даются, вместе с химиотерапией, для того чтобы помочь поддержать иммунную систему. Когда раковые пациенты получают химиотерапию, способность костного мозга вырабатывать новые кровяные клетки подавляется, что делает пациентов более подверженными развитию инфекций. Отдельные части иммунной системы не могут функционировать без кровяных клеток, таким образом колониестимулирующие факторы способствуют тому, чтобы стволовые клетки костного мозга вырабатывали белые кровяные клетки, тромбоциты и красные кровяные клетки.

При достаточном образовании клеток, другие способы лечения рака могут продолжаться, что дает пациентам возможность безопасного получения более высокой дозы химиотерапии.

В другом варианте воплощения биопродуктом является антитело. Антитела, напр., моноклональные антитела, являются агентами, производимыми в лабораторных условиях, которые связываются с раковыми клетками.

Когда разрушающие рак агенты вводятся в организм, они находят антитела и убивают раковые клетки. Агенты моноклональных антител не разрушают здоровые клетки. Моноклональные антитела достигают своего терапевтического эффекта благодаря различным механизмам. Они могут оказывать прямое влияние на появление апоптозов или программируемую гибель клеток. Они могут блокировать рецепторы факторов роста, эффективно останавливая пролиферацию опухолевых клеток. В клетках, которые экспрессируют моноклональные антитела, они могут привести к образованию анти-идиотипичных антител.

Примеры антител, которые можно использовать в комбинированной терапии настоящего изобретения, включают анти-CD20 антитела, такие как, но не ограничиваясь, цетуксимаб, тозитумомаб, ритуксимаб и ибритумомаб. Анти-HER2 антитела также могут быть использованы в комбинации с фактором влияния изобретения для лечения рака. В одном варианте воплощения, анти-HER2 антителом является Трастузумаб (Герцептин). Другие примеры антител, которые могут быть использованы в комбинации с фактором влияния для лечения рака, включают анти-CD52 антитела (напр., Алемтузумаб), анти-CD-22 антитела (напр., Эпратузумаб), и анти-CD33 антитела (напр., Немтузумаб озогамицин). Анти-

VEGF антитела также могут быть использованы в комбинации с фактором влияния для лечения рака. В одном варианте воплощения анти-VEGF антителом является бевацизумаб. В других воплощениях биологическим агентом является антитело, которое является анти-EGFR антителом, напр., цетуксимабом. Другим примером является антигликопротеин 17-1A антитело эдреколомаб.

В другом варианте воплощения биопродуктом является цитокин. Терапия цитокинами использует белки (цитокины), которые помогают иммунной системе субъекта распознавать и разрушать те клетки, которые являются раковыми. Цитокины образуются естественным образом в организме иммунной системой, но их также можно производить в лаборатории. Эта терапия используется при продвинутой меланоме и при вспомогательной терапии (терапии, которая дается после или в дополнение к основному лечению рака). Терапия цитокинами охватывает все части организма, убивая раковые клетки и подавляя рост опухолей.

В другом варианте воплощения биопродукт является гибридным белком. Например, рекомбинантный человеческий Apo2L/TRAIL (Генентеч) может быть использован в комбинационной терапии. Apo2/TRAIL является первым двойным про-апоптозным рецептором агонистом, разработанным для активации проапоптозных рецепторов DR4 и DR5, которые участвуют в регуляции апоптозов (программируемой гибели клеток).

В одном варианте воплощения биопродукт является молекулой антисмысловой нуклеиновой кислоты.

При использовании здесь, "антисмысловая" нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна "смысловой" нуклеотидной кислоте, кодирующей белок, напр., комплементарна кодирующей нити двунитевой молекулы кДНК , комплементарна последовательности мРНК или комплементарна кодирующей нити гена. Соответственно, антисмысловая нуклеиновая кислота может связываться водородными связями со смысловой нуклеиновой кислотой.

В одном варианте воплощения биопродукт является миРНК молекулой, напр., молекулой, которая усиливает ангиогенез, напр., bFGF, VEGF и EGFR. В одном варианте воплощения биологический агент, который ингибирует ангиогенез, опосредует РНКи. РНК интерференция (РНКи) – это постранскрипционный процесс, который подавляет экспрессию определенных

генов, использующий двунитевую РНК (днРНК) для деградации мессенджера РНК (мРНК), содержащего ту же последовательность, что и днРНК (Sharp, P.A. и Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999); Cottrell TR, и Doering TL. 2003. Trends Microbiol. 11:37-43; Bushman F.2003. MoI Therapy. 7:9-10; McManus MT и Sharp PA. 2002. Nat Rev Genet. 3.737-47). Процесс происходит, когда эндогенная рибонуклеаза расщепляет длинную днРНК на более короткие фрагменты, напр., на РНК длиной 21 или 22 нуклеотида, называемые малыми интерферирующими РНК или миРНКРНКs. Маленькие фрагменты РНК затем опосредуют деградацию целевой мРНК. Наборы для синтеза РНКи доступны в продаже, напр., у New England Biolabs или Ambion. В одном варианте воплощения может быть задействован один или более реактивов для использования в антисмысловой РНК в молекулах, которые опосредуют РНКи.

Использование антисмысловых нуклеиновых кислот для отрицательного регулирования экспрессии определенного белка в клетке хорошо известно специалистам (см. напр., Weintraub, H. et al., Антисмысловая РНК как молекулярный инструмент для генетического анализа, обзоры - тенденции в генетике, Том 1(1) 1986; Askari, F.K. и McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334:316- 318; Bennett, M.R. и Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92:1981-1993; Mercola, D. и Cohen, J.S. (1995) Cancer Gene Ther. 2:47-59; Rossi, JJ. (1995) Br. Med. Bull. 51.217-225; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335). Антисмысловая нуклеиновая молекула содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна кодирующей нити другой нуклеиновой молекулы (напр., последовательность мРНК) и соответственно может водородными связями связываться с кодирующей нитью другой нуклеиновой молекулы. Антисмысловые последовательности, комплементарные последовательности мРНК, могут быть комплементарны последовательности, находящейся в кодирующем участке мРНК, в 5' или 3' нетранслирующем участке мРНК или участке, соединяющим кодирующий участок и нетранслирующий участок (напр., связь 5' нетранслирующего участка и кодирующего участка). Кроме того, антисмысловая нуклеиновая кислота может быть комплементарна последовательности регуляторного участка гена, кодирующего мРНК, например, последовательности инициации транскрипции или регуляторного элемента. Предпочтительно,

антисмысловая нуклеиновая кислота создана так, чтобы быть комплементарной участку, предшествующему или перекрывающему инициирущий кодон кодирующей нити или в 3' нетранслируемом участке мРНК.

Предоставляя последовательность кодирующей нити молекулы, которая усиливает ангиогенез, антисмысловые нуклеиновые кислоты изобретения могут быть созданы по правилам спаривания оснований Уотсона и Крика. Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть комплементарна всему кодирующему региогу мРНК, но более предпочительны олигонуклеотиды, которые являются антисмысловыми только для части кодирующего или некодирующего участка мРНК. Например, антисмысловой олигонуклеотид может быть комплементарен участку, соседнему с сайтом начала трансляции мРНК. Длина антимыслового нуклеотида может составлять, например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нуклеотидов в длину.

Антисмысловая нуклеиновая кислота изобретения может быть создана с использованием химического синтеза и ферментных реакций лигирования с использованием процедур, известных специалистам. Например, антисмысловая нуклеиновая кислота (напр., антисмысловой олигонуклеотид) может быть химически синтезирована с использованием существующих в природе нуклеотидов или различных модифицированных нуклеотидов, разработанных для повышения биологической стабильности молекул или повышения физической стабильности дуплексов, образованных между антисмысловой и смысловой нуклеиновой кислотами, напр., могут быть использованы производные фосфоротиолата и нуклеотиды с замещенным акридином. Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы в производстве антисмысловой нуклеиновой кислоты, включают 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометил урацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метиллинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиацетиловую

кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, урацил-5-оксиацетиловую кислоту, метиловый эфир оксиацетиловой кислоты, урацил-5-окиацетиловую кислоту (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил, (acp3)w, и 2,6-диаминопурин. Для подавления экспрессии в клетках, можно использовать один или более антисмысловых олигонуклеотидов. Альтернативно, антисмысловая нуклеиновая кислота может быть произведена биологически, с использованием вектора экспрессии, в котором нуклеиновая кислота субклонирована в антисмысловой ориентации (т.е., РНК, транскрибируемая из встроенной нуклеиновой кислоты, будет в антисмысловой ориентации по отношению к целевой нуклеиновой кислоте, что будет описано в дальнейшем в соответствующем разделе).

В еще одном варианте воплощения молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты изобретения является а-аномерной молекулой нуклеиновой кислотой. А-аномерная нуклеиновая кислота образует специфические двунитевые гибриды с комплементарной РНК, в которых, в отличие от обычных а-единиц, нити располагаются параллельно друг другу (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15:6625-6641). Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты может также включать 2'-о-метилрибонуклеотид (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) или химерный РНК-ДНК аналог (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330).

В другом варианте воплощения антисмысловая нуклеиновая кислота изобретения является соединением, которое опосредует РНКи. РНК интерферирующие агенты включают, не ограничиваясь, молекулы нуклеиновых кислот, включая РНК молекулы, которые являются гомологами целевых генов или геномных последовательностей, "малой интерферирующей РНК" (миРНК), "короткой шпильки" или "малой шпильки РНК" (мшРНК), и малых молекул, которые интерферируют или подавляют экспрессию целевого гена путем РНК-интерференции (РНКи). РНК интерференция (РНКи) -- это постранскрипционный процесс, который подавляет экспрессию определенных генов, использующий двунитевую РНК (днРНК) для деградации мессенджера РНК (мРНК), содержащего ту же последовательность, что и днРНК (Sharp, P.A. и Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999)). Процесс происходит, когда эндогенная

рибонуклеаза расщепляет длинную днРНК на более короткие фрагменты, напр., на РНК длиной 21 или 22 нуклеотида, называемые малыми интерферирующими РНК или миРНКРНКs. Маленькие фрагменты РНК затем опосредуют деградацию целевой мРНК. Наборы для синтеза РНКи доступны в продаже, напр., у New England Biolabs или Ambion. В одном варианте воплощения может быть задействован один или более реактивов, описанных выше для использования в антисмысловой РНК.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы, которые, напр., ингибируют ангиогенез, могущие быть введены субъекту в форме, подходящей для эксрпессии кодируемого белка в клетках субъекта, также могут быть использованы в способах изобретения. Примеры молекул, которые ингибируют ангиогенез, включают, не ограничиваясь, TSP-I, TSP-2, IFN-g, IFN-a, ангиостатин, эндостатином, тумастатин, канстатин, VEGI, PEDF, вазогибин и 16 кДа фрагментф пролактина 2-метоксиэстрадиола (см, Kerbel (2004) J. Clin Invest 114:884, в качестве обзора).

Например, полноразмерная или частичная последовательность кДНК клонируется в рекомбинантном векторе экспрессии, и вектор вводится в клетку с использованием стандартных техник молекулярной биологии. аДНК может наблюдаться, например, при амплификации с использованием полимеразно-цепной реакции (ПЦР) или путем скринирования соответствующей библиотеки сДНК. Нуклеотидные последовательности кДНК могут использоваться для создания праймеров для ПЦР, которые позволяют амплифицироваться сДНК стандартными ПЦР-методами или для разработки гибридизационной пробы, которая может использоваться для скринирования сДНК библиотеки с использованием стандартных методов гибридизации. После выделения или амплификации кДНк фрагменты ДНК вводятся в подходящий вектор экспрессии.

Примеры биологических агентов для использования в способах изобретения включают, не ограничиваясь, гефитиниб (Iressa), анастразол, диэтилстилбестерол, эстрадиол, премарин, ралоксифен, прогестерон, норэтинодрел, эстистерон, диместистерон, ацетат мегестрола, ацетат медроксипрогестерона, капроат гидроксипрогестерона, норэтистерон, метилтестостерон, тестостерон, дексамтазон, преднизолон, кортизол, солюмедрол, тамоксифен, фулвестрант, торемифен, аминоглутетимид, тестолактон,

дролоксифен, анастрозол, бикалутамид, флутамид, нилутамид, гозерелин, флутамид, леупролид, трипторелин, аминоглутетимид, митотан, гозерелин, цетуксимаб, эрлотиниб, иматиниб, Тозитумомаб, Алемтузумаб, Трастузумаб, Гемтузумаб, Ритуксимаб, Ибритумомама тиуксетан, Бевацизумаб, Денилейкин дифтитокс, Даклизумаб, интерферон альфа, интерферон бета, анти-4-lBB, анти-4-lBBL, анти-CD40, анти-CD 154, анти- OX40, анти-OX40L, анти-CD28, анти-CD80, анти-CD86, анти-CD70, анти-CD27, анти- HVEM, анти-LIGHT, анти-GITR, анти-GITRL, анти-CTLA-4, растворимый OX40L, растворимый 4-IBBL, растворимый CD154, растворимый GITRL, растворимый LIGHT, растворимый CD70, растворимый CD80, растворимый CD86, растворимый CTLA4-Ig, GVAX®, и их комбинации, которые очевидны специалистам на основе соответствующих стандартов лечения определнной опухоли или рака. Растворимые формы агентов могут быть сделаны как, например, гибридные белки, путем связи агента, например, с Ig-Fc участком.

Следует заметить, что более чем один добавочный агент, напр., 1, 2, 3, 4, 5, может быть введен в комбинации с фактором влияния. Например, в одном варианте воплощения два химиотерапевтических агента могут быть введены в комбинации с фактором влияния. В другом варианте воплощения могут быть введены химиотерапевтический агент, биологический агент и фактор влияния.

Могут быть использованы различные формы биологических агентов. Они включают, без ограничений, такие формы, как молекулы-предшественники, незаряженные молекулы, молекулярные комплексы, соли, эфиры, амиды, и тому подобные, которые являются биологически активными, будучи имплантированы, инъецированы или иным образом введены в опухоль.

Настоящее изобретение в дальнейшем иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех ссылок и опубликованных патентов и заявок на патенты, цитируемых в заявке, включены в настоящую заявку путем ссылки.

ПРИМЕРЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение, описанное на данный момент в целом, будет лучше понято благодаря ссылкам на следующие примеры, которые включены

только с целями иллюстрации определенных аспектов и модификаций настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение, поскольку специалист распознает из данных здесь описаний и следующих примеров, другие способы, агенты, соединения, или способы анализа данных, все без ограничения, которые могут быть применены, не выходя за заявленный объем формулы изобретения.

Содержание всех патентов, заявок на патенты, публикаций патентов или научных статей, цитируемых в любом месте этой заявки, включены в настоящую заявку путе ссылки в полном объеме.

Практика настоящего изобретения использует, в случае соответствия и если не указано иное, стандартные техники клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, вирусологии, рекомбинатной ДНК и иммунологии, известные специалистам. Такие техники описаны в литературе. См., например, Молекулярное клонирование: лабораторное пособие, 3е изд., под ред. Sambrook и Russell (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001); учебник Способы в энзимологии (Academic Press, Inc., N.Y.); Применение антител, вторая редакция под ред. Harlow и Lane, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Действующие протоколы в клеточной биологии, под ред. Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford, и Yamada, John Wiley и Sons, Inc., New York, 1999; и Протоколы ПЦР, под ред. Bartlett et al., Humana Press, 2003.

Пример 1: Идентификация CoQ10 как MBM

Для того чтобы оценить CoQ10 как потенциальную MBM, CoQ10 в окисленной форме был экзогенно добавлен к группе клеточных линий, включая как линии раковых клеток, так и линии нормальных контрольных клеток, и были оцененыизменения, вызванные в профиле клеточного микроокружения для каждой клеточной линии из группы. Были оценены изменения в клеточной морфологии/физиологии и в составе клетки, включая уровни мРНК и белков, и проведено сравнение по этим параметрам больных и здоровых клеток. Результаты этих экспериметов идентифицировали CoQ10 и, в особенности, окисленную форму CoQ10, как MBM.

В первой серии экспериментов изменения в клеточной морфологии/физиологии были оценены при исследовании чувствительности и апоптозного ответа клеток к CoQ10. Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неместастазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; или SCC, плоскоклеточная карцинома; PaCa2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций коэнзима Q10. Результаты этих экспериментов показывают, что линии раковых клеток демонстрируют дозозависимый ответ, отличный от ответа линий контрольных клеток, при этом индукция апоптоза и смерть клеток происходят только в раковых клетках. Примеры экспериментов описаны детально в примере 3 ниже.

Затем были проведены исследования для оценки изменений в составе клеток после обработки CoQ10. Изменения в экспрессии генов на уровне мРНК анализировались с использованием метода ПЦР в режиме реального времени. Примеры экспериментов описаны детально в Примерах 6 и 9-13 ниже. В дополнительных экспериментах, изменения в экспрессии генов по уровню белка анализировались с использованием метода антител на микрочипах, 2-мерного гель электрофореза, за которым следовала идентификация белка с использованием масс-спектрометрии, и иммуноблоттинга. Примеры экспериментов описаны детально ниже в Примерах 4, 7 и 8, соответственно. Результаты этих исследований демонстрируют, что важные изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка, были вызываны в исследуемых клеточных линиях благодаря добавлению окисленной формы CoQ10. Было обнаружено, что гены, модулированные воздействием CoQ10, группировались по различным клеточным путям, включая апоптозы, биологию рака и роста клетки, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Были проведены эксперименты для подтверждения вхождения CoQ10 в клетку и определения концентрации и формы CoQ10, присутствующего в клетке. В частности, концентрация коэнзима Q10, а также форма CoQ10 (т.е., окисленная или восстановленная), присутствующего в митохондриях, была определена путем анализа богатых митохондриями препаратов, выделенных из клеток,

обработанных CoQ10. Было подтверждено, что концентрация коэнзима Q10, присутствующего в митохондриях, возрастает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенного Q10. Непредсказуемым и неожиданным результатом явилось то, что было установлено присутствие CoQ10 в митохондриях преимущественно в окисленной форме. Кроме того, изменения в концентрациях белков из богатых митохондриями образцов были проанализированы с использованием 2-D гель электрофорезов и идентификации белка путем масс-спектрометрии. Результаты этих экспериментов показали, что концентрации окисленной формы CoQ10 в митохондриях, определяемые на различных временных точках, коррелируют с широким многообразием клеточных изменений, что доказывается путем модуляции мРНК и концентраций белка для специфических белков, связанных с путями метаболизма и апоптоза. Примеры экспериментов детально описаны в Примере 5 ниже.

Результаты, описанные здесь в Приложениях, идентифицировали эндогенную молекулу CoQ10 и, в особенности, окисленную форму CoQ10, как МВМ. Например, результаты идентифицировали CoQ10 как МВМ, поскольку наблюдалось, что CoQ10 вызывал изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка. Результаты показали, что CoQ10 имеет многоаспектный характер, поскольку CoQ10 вызывал различные изменения в клеточной морфологии/физиологии и клеточном составе (напр., различные изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка), в состоянии болезни (напр., раке) по сравнению с нормальным (напр., нераковым) состоянием. Больше того, результаты показали, что CoQ10 имеет многоаспектный характер, поскольку CoQ10 был способен входить в клетки и таким образом демонстрировал как терапевтическое действие, так и функции носителя.

Пример 2: Способы идентификации связанных с болезнью процессов и биомаркеры онкологических заболеваний

Из клеточных исследований, в которых клеточные линии обрабатывались изучаемыми молекулами, по количеству мРНК, количеству белковых антител и по 2D гель-электрофорезу были оценены различия между обработанными и необработанными клетками. Белки, идентифицированные по сравнительным

анализам образцов как модулированные MBM или эпи-переключателем, оценивались по перспективе системной биологии с использованием анализа метаболизма (программа Ingenuity IPA) и обзору известной литературы. Белки, идентифицированные как потенциальные терапевтические или биомаркерные мишени, подвергались подтверждающим анализам, таким как иммуноблоттинг, нокаут миРНК или создание рекомбинантных белков и характеризующие способы.

Материалы и способы для Примеров 3-8

Коэнзим Q10 исходный раствор

А 500 мкМ коэнзима Q10 (5% изопропанол в среде для роста клеток) был приготовлен следующим образом. 10 мл 500 мкМ исходного раствора коэнзима Q10 приготовлялся свежим каждый раз.

Молекулярный вес: 863,34

(0,0005 моль/л)(0,010 л)(863,34 г/моль) = 0,004317 г

Чтобы приготовить 10 мл 500 мкМ исходного раствора, 4,32 мг коэнзима Q10 взвешивалось в 15 мл пробирке Falcon, и добавлялось 500 мкл изопропанола. Раствор нагревался на 50-60 °С водяной бане при перемешивании до полного растворения. К этому раствору добавлялось 9,5 мл среды (той же среды, в которой росли клетки).

Клеточная культура

Клетки были получены из коллекции культур американского типа или Gibco. Клетки выращивались в среде DMEM/F-12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 0?25 мкг/мл амфотерицина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 U мл-1 пенициллина. Клетки содержались в атмосфере 95% воздуха и 5% CO2 при 37 градусах С.

Обработка коэнзимом Q10 и выделение общего белка

Клетки росли до 85% заселенности до того, как их подвергали влиянию Q10. В среду добавили Q10 в таком количестве, чтобы получить 50 и 100 микромолярные концентрации. Колбы были разделены на контроль, 50 мкМ Q10 и 100 мкМ Q10. Белок был выделен из обработанных и контрольных колб через 4, 8, 12 и 24 часа. Для выделения белков клетки были промыты три раза 5 мл ледяного PBS с pH 7,4. Затем клетки были промыты в 3 мл PBS, осаждены

центрифугированием и ресуспендированы в лизирующем буфере с pH 7,4 (80 мМ TRIS-HCl, 1% SDS, с ингибиторами протеазы и фосфатазы). Концентрации белка были подсчитаны с использованием метода BCA.

Клеточные линии

Клеточные линии, перечисленные ниже, были размножены и для каждой создан клеточный банк. Было получено большое число клеток для различных исследований и собран материл для анализов. Как правило, когда для поддержания клеточных линий не требовалась определенная клеточная среда, используемой для роста клеток средой была DMEMF-12 с 5% сывороткой. Клетки как правило росли до 75-80% заселенности (свободного пространства) перед сбором и использованием в клеточных исследований и последующими стандартными способами. Для экспериментов были взяты следующие клеточные линии:

SK-MEL-28 (неметастазирующая меланома кожи)

SK-MEL-2 (метастазирующая меланома кожи)

HEKa (кератиноциты, кожный контроль)

HEMa (меланоциты, кожный контроль)

nFIB (неонатальные фибробласты)

HEP-G2 (рак печени) [SBH линия клеток]

SkBr-3 (рак молочной железы, Her2 сверхэкспрессия)

MCF-7 (рак молочной железы, p53 мутация)

PC-3 (рак простаты) [SBH линия клеток]

SkBr-3 (аденокарцинома молочной железы человека)

NCI-ES-0808

SCC (плоскоклеточная карцинома)

PaCa-2

NIH-3T3

Клеточная культура:

Клетки были получены из коллекции культур американского типа или Gibco. Клетки выращивались в среде DMEM/F-12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 0,25 мкг/мл амфотерицина, 100 мкг/мл

стрептомицина и 100 U мл-1 пенициллина. Клетки содержались в атмосфере 95% воздуха и 5% CO2 при 37 градусах С.

Клетки злокачественной меланомы кожи SK-MEL28 росли и содержались DMEM/F12 с Глютамаксом (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния) с добавкой 5% FBS, амфотерицина и пенициллина/стрептомицина. Клетки росли при 37 °С с 5% CO2. Детали дополнительных клеточных линий и словий роста перечислены в таблице ниже.

Таблица 1. Клеточные линии, анализированные на чувствительность к Q10.

Клеточная линия	**Описание**	**Условия роста**
PaCa2	Карцинома поджелудочной железы	DMEM/F12 с Глютамакс + 10%FBS, 2.5% лошадиная сыворотка, амфотерицин, пенициллин/стрептомицин.
HepG2	Гепатоцеллюлярная карцинома	MEM с солями Earles с добавлением 10% FBS, амфотерицина, пенициллина/стрептомицина, пирувата натрия и заменимых аминокислот.
PC3	Аденокарцинома простаты	DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5%FBS, амфотерицина и пенициллина/стрептомицина.
SKBr3	Рак молочной железы	DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5% FBS и амфотерицина, пенициллина/стрептомицина.
MCF-7	Рак молочной железы	DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5% FBS и амфотерицина, пенициллина/стрептомицина.

Обработка Q10 SKMEL28 клеток:

SK-MEL28 клетки были обработаны 100 мкМ Q10 или контрольным раствором. Q10 был приготовлен следующим образом. В 15 мл пробирку с крышкой было перенесено 4,32 мг Q10 (производство Cytotech) и затем растворено добавлением 500 мкл изопропанола. Получившийся раствор был нагрет на 65°С водяной бане и размешан на вортексе на большой скорости. Раствор Q10/изопропанола был доведен до объема 10 мл добавлением отстоявшейся среды для клеточной культуры. Исходный раствор затем был размешан на вортексе для достижения максимальной растворимости Q10. Исходный раствор был разведен (2 мл исходного раствора и 8 мл среды) для

получения конечной концентрации 100 мкмМ Q10. Для контрольного раствора к 9,5 мл среды было добавлено 500 мкл изопропанола. Контрольный исходный раствор был затем разведен (2 мл исходного раствора) 8 мл среды. Клетки собирались через 6, 16, 24, 48 или 72 часа после начала обработки.

Обработка клеток Q10 SCC:

SCC клетки были обработаны 100 мкМ Q10 (подготовленным как описано выше) или 6 часов, или 24 часа. Контрольными клетками были необработанные клетки. Клетки были собраны и осаждены через различное время после обработки и осадок был заморожен свежим и хранился при -80 °C, пока РНК не было выделено по XTAL как описано ниже.

Выделение РНК:

Клетки после различного времени обработки были лизированы для выделения РНК с использованием RNeasy Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia CA) по инструкциям производителя. РНК было подсчитано путем определении оптической плотности при 260 нм.

Синтез первой нити:

Первая нить кДНК была синтезирована с 1 мкг общей РНК с использованием набора для синтеза первой нити RT2 (SABiosciences., Frederick Мэриленд) по рекомендациям производителя.

ПЦР в режиме реального времени:

Продукты синтеза первой нити были растворены в воде, смешаны с SYBR зеленой мастер-микс (реакционная смесь, SABiosciences., Frederick, Мэриленд) и помещены в прибор для ПЦР анализа. ПЦР в режиме реального времени была осуществлена для нескольких аналитических наборов (апоптозные анализы, диабетические анализы, анализы акислительного стресса и оксидантной защиты, и анализы белков теплового шока) (SABiosciences, Frederick, Мэриленд) на Biorad CFX96.

Определение чувствительности клеточных линий к коэнзиму Q10 путем Nexin анализа для апоптозов:

Процент клеток в раннем и позднем апоптозах был подсчитан через 24 часа после обработки коэнзимом Q10. Ранний и поздний апоптозы использовались как маркеры для понимания различий в чувствительности различных линий раковых

клеток к коэнзиму Q10. Различными тестируемыми клеточными линиями были PaCa2, HepG2, PC-3, SKBr3, MCF-7 и SK-MEL28. Клеткам дали адгезировать в течение ночи в 96-луночных планшетах. Эти клетки были обработаны контрольным раствором, 50 мкМ Q10 или 100 мкМ коэнзима Q10. Через 24 часа наличие апоптозных клеток было оценено на проточном цитометре PCA96 (Guava Technologies, Hayward, Калифорния). Кроме того, некоторые клетки были обработаны 4 мкМ Стауроспорином в течение 2 часов в качестве позитивного контроля на апоптозы. Клетки были промыты PBS и диссоциированы 50 мкл Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, Калифорния) при комнатной температуре. Диссоциация была остановлена добавлением культуральной среды, содержащей 1% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St.Louis, Миссури). Затем 100 мкл Nexin реагента (Guava Technologies, Hayward, Калифорния) было добавлено в каждую лунку. Через 20 минут инкубации в темноте исследование проводилось в чашках со слабой адгезией для минимизации повторного присоединения клеток к субстрату. Nexin реагент содержит два красителя. Annexin-V-PE, который определяет уровень фосфотидил серина на внешней стороне клеток, характеризирует ранние апоптозные клетки. Второй краситель, 7-AAD проникает только в поздние апоптозные клетки, что отличает их от живых (здоровых) и ранних апоптозных клеток. Процент четырех популяций клеток: живых, ранних апоптозных, поздних апоптозных и остатков клеток определялся с использованием программы Cytosoft 2.5.7 (Guava Technologies, Hayward, Калифорния).

Иммуноблоттинг

Примерно 50 мкг белка исследовалось на образец путем иммуноблоттинга. Все эксперименты были поставлены трижды плюс контроль. Белки были разделены в 12% TRIS-HCl геле, перенесены путем электрофореза на нитроцеллюлозные мембраны и блокированы с использованием 5% сыворотки и TBST раствором перед инкубацией с первичными антителами. Первичные антитела инкубировались в течение ночи при 4 градусах С в 5% BSA и TBST растворе. Вторичные антитела инкубировались в течение одного часа при 4 градусах. Все антитела были получены по технологии клеточной сигнализации. Антитела были использованы в соотношении 1:1000, за исключением β-Актина, соотношение которого составляло 1:5000. Блоты были получены и результаты были подсчитаны

с использованием NIH Java денсинометра и программы Image J. Все блоты были также исследованы и нормализованы по соответствующей экспрессии β-актина.

Двухмерные электрофорезы

Перед изоэлектрическим фокусированием (IEF), образцы были растворены в 40 мМ Tris, 7 М мочевине, 2 М тиомочевине, и 1% C7 цвиттерионным детергентом, восстановлены трибутилфосфином и алкилированы 10 мМ акриламидом в течение 90 мин при комнатной температуре. После этого образцы были проведены через 10-кДа прибор Amicon Ultra, по меньшей мере, с 3 объемами ресуспендирующего буфера, содержащего 7 М мочевину, 2 М тиомочевину и 2% CHAPS для восстановления проводимости образца. Одна сотня микрограмм белка была подвергнута IEF при 11-см pH от 3 до 10, pH от 4 до 7 или pH от 6 до 11 на полосках с фиксированным градиентом pH (GE, Amersham, USA) to 100,000 вольт-час. После IEF, полоски с фиксированным градиентом pH были откалиброваны в 6 М мочевине, 2% SDS, 50 мМ Tris-ацетат буфере, pH 7,0, и 0,01% бромфеноле голубом и поставлен SDS-полиактриламид гель электрофорез на 8-16% Tris-HCl Precast Gel, 1 мм (Bio-Rad, USA). Электрофорезы в геле были поставлены дважды. Затем они останавливались в SYPRO Ruby, 80 мл/гель (Invitrogen, USA) и получали их изображение на Fuji FLA-5100 лазерном сканере или переносили на PVDF мембрану.

Дополнительная информация была получена для контрольных образцов для определения полезности белковой идентификации при использовании способов, которые используют dPC (Protein Forest Inc.) избирательное pI фракционирование, за которым следует трипсиновое расщепление dPC комплексом с масс-спектрометрии идентификацией и полу-подсчетом (Nanomate или LC/LTQ/MS). The dPC анализы, проведенные с контрольными образцами, показали свою полезность для идентификации большой субпопуляции белков. Материалы, полученные в ходе исследований, были направлены в архив, так чтобы их можно было использовать в качестве источника для необходимых в будущем исследований.

Анализ изображений 2D-геля:

Анализы всех изображений геля были осуществлены с использованием Progenesis Discovery и Pro (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne, Великобритания). После детекции точек, совмещения, фоновой субтракции,

нормализации и фильтрации данные для SYPRO Ruby гель изображений были экспортированы. Парные сравнения между группами были проведены с использованием критерия Стьюдента для идентификации точек, экспрессия которых достоверно изменилась ($p > 0,05$).

Исследование с помощью антител:

Микрочип для антител (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скринингового исследования с помощью 700 белковых антител для оценки изменений в уровнях концентрации белков в обработанных Q10 клетках (SK-MEL-28, SCC). Экспрессия белка в клеточном экстракте устанавливалась, когда белок связывался с соответствующим антителом, помещенным на пластинку. Перед связыванием белки прямо метились флюоресцентным красителем, который потом использовался для флюоресцентной визуализации и количественного анализа. Исследование использовалось для сравнения белковых профилей экспрессии в двух образцах (исследуемый и референсный образцы), каждый метился различным Cy красителем (Cy3 или Cy5) и два образца использовались совместно в равных белковых концентрациях в исследовании. Интенсивность флюоресцентного сигнала для каждого образца затем записывалась отдельно на длине волны, соответствующей красящей метке образца, и сравнивалась.

Высокие дозы коэнзима Q10 регулируют экспрессию генов, включенных в апоптозный, диабетический и окислительного стресса пути в культивируемых SKMEL-28 клетках.

Детали эксперимента: SKMEL-28 клетки (ATCC Каталог # HTB-72) являются неместастазирующими клетками меланомы кожи, которые выращивались в среде DMEM/F-12, содержащей Глютамакс (Invitrogen Cat# 10565-042), с добавлением 5% FBS, пенициллина, стрептомицина и амфотерицина, были обработаны средой или 100 мкМ коэнзима Q10 в течение различного времени. Любые изменения в экспрессии генов, следовавшие за обработкой коэнзимом Q10, были подсчитаны с использованием методов ПЦР в режиме реального времени (Apoptosis Cat #PAHS-12, Diabetes Cat #PAHS-023 и Oxidative Stress Cat #PAHS-065). (SABiosciences, Frederick, Мэриленд).

Исходная концентрация 500 мкМ коэнзима Q10 была приготовлена путем растворения 4,32 мг в 500 мкл изопропанола, который затем разводился до 10 мл

добавлением среды. Альтернативно выполналось перемешивание и нагрев до 65^{0}C растворенного Q10. 2 мл исходного раствора разводилось до 10 мл средой для получения среды, содержащей 100 мкМ Q10, которая использовалась для обработки клеток. Параллельно приготовлялся контрольный раствор по тому же протоколу, за исключением того, что коэнзим Q10 не добавлялся.

SKMEL-28 клетки были помещены с плотностью 1x10^5 клеток на лунку в 6-луночный планшет. Через 24 часа, когда клетки прикрепились и заселенность составляла 50%, добавили контрольный раствор или 100 мкМ Q10. Клетки были собраны через 6, 16, 24, 48 или 72 часа после обработки Q10, а обработанные контрольным раствором клетки были собраны через 24 часа. Клетки лизировались для выделения РНК в течение различного времени обработки с использованием мини-набора RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, Калифорния, Cat #74104) по инструкциям производителя с использованием микроцентрифуги и обработки ДНКазой. Количество РНК определялось при определении оптической плотности на 260 нм.

ПЦР в режиме реального времени проводилось путем синтеза с первой нити кДНК с использованием 0,4-1 мкг общей РНК в качестве матрицы с использованием набора синтеза первой нити RT2 (SABiosciences., Frederick, Мэриленд, Cat# C-03) с этапом элиминации геномной ДНК в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты синтеза с первой нити были растворены в воде, смешаны с SYBR зеленой мастер-микс (реакционная смесь, SABiosciences., Frederick, Мэриленд, Cat#PA-010-12) и с ними были проведены ПЦР-анализы с праймерами для 84 различных генов, связанных с обычным метаболизмом, 5 конститутивных генов, использованных для нормализации, обратной транскрипции и ПЦР-контроля. ПЦР в режиме реального времени проходила в Biorad Cfx96. Амплификация была начата горячим стартом для активации фермента, продолжалась 40 циклов (95^{o}C -15 секунд этап денатурации и 60^{o}C- 1 минута этап отжига и удлинения), с последующей программой кривой плавления. Значения Ct, полученные от ПЦР термоциклера по всем обработанным группам, были занесены в таблицу Excel и загружены в программу сравнительного анализа, доступную по адресу www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php.

Очистка богатых митохондриями образцов:

Детали эксперимента: SKMEL-28, NCI-ES0808 и NIH-3T3 клетки,

обработанные 100 мкМ Q10 24 или 48 часов вместе с клетками, которые были собраны при t=0, промыты и извлечены из колб T160. Клетки центрифугировали, собрали осадок, заморозили и хранили при -80 ^{0}C до выделения митохондрий. Клеточный осадок был разморожен, ресуспендирован и измельчен в гомогенизаторе Даунса. Гомогенат был центрифугирован и митохондрии выделены с использованием реагентов и протокола, рекомендованных набором выделения митохондрий для культурных клеток (MitoSciences, Eugene, Орегон, Cat # MS852). Фракция митохондрий была разделена на аликвоты и хранилась при -80oC.

Способ подсчета Коэнзима Q10 и Убихинола-10:

Способ одновременного определения коэнзима Q10 (Q10) и восстановленной формы убихинола-10 (Q10H2) был выполнен на основе недавно опубликованного способа (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chromatogr. A, 1175, 242-248) благодаря использованию LC–MS/MS с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме определения положительных ионов. Возможны высоко избирательная идентификация и чувствительный подсчет Q10 и Q10H2, вкупе с идентификацией других выбранных липидов. Аликвота богатых митохондриями образцов из SK-MEL-28, обработанных 100 мкМ Q10, была подвергнута стандартной пре-обработке, основанной на осаждении белка (100 мкл клеточного осадка, диспергированного ультразвуком в 300 мкл 1-пропанола), экстракции жидкость–жидкость (добавить 100 мкл воды к супернатанту и экстрагировать X3 200 мкл н-гексана), выпаривани комбиниованных гексановых экстрактов до высыхания и восстановлению в 50 мкл of 95:5 метанол/гексан (по объему). Анализ был проведен LC-MS/MS на Waters Quattro II тройном квадрупольном масс-спектрометре с Prism RP 1 X 100 мм, колонками с частицами размером 5 мкм (Keystone Scientific). Изократическое элюирование с 4 мМ формиата аммония в смеси 20% изопропилового спирта и 80% метанола со скоростью потока 50 мкл/мин. Было введено десять мкл каждого образца. MRM анализ был проведен с использованием m/z 882,7>197,00 (Q10H2) и m/z 880,80>197,00 (Q10) переходов с напряжением на конусе 40 и энергией столкновений 30.

ПРИМЕР 3: Чувствительность клеточных линий к CoQ10

Множество клеточных линий тестировались на чувствительность к Q10 после 24 часов обработки с использованием реагента (Nexin реагент), который содержит два типа красителей, 7AAD и Annexin-V-PE. Краситель 7-AAD проникает в клетки с проницаемой мембраной, в первую очередь в те клетки, которые находятся на поздней стадии апоптоза. Annexin-V-PE – это краситель, который связывается с фосфотидил серином, который появляется на внешней поверхности плазматической мембраны у ранних апоптозных клеток. Nexin реагент таким образом может быть использован для различения популяций апоптозных клеток в проточном цитометре.

PaCa2 клетки показали увеличение как ранних, так и поздних апоптозных клеток (5-10% отобранных клеток) с 50 мкМ Q10 и 100 мкМ Q10 после 24 часов обработки Q10. PC-3 клетки также показали увелечение как ранней, так и поздней апоптозной популяции с 50 мкМ и 100 мкМ Q10, хотя возрастание было меньше по сравнению с PaCa2 клетками. MCF-7 и SK-MEL28 клетки показали возрастание только ранней апоптозной популяции с 50 мкМ и 100 мкМ Q10. HepG2 клетки также были чувствительны к обработке 50 мкМ Q10, где наблюдалось возрастание поздних апоптозных и ранних апоптозных стадий на около 20% от отобранных клеток. SKBr3 была единственной исследованной клеточной линией, которая не показала никакого значимого увеличения ранних и поздних апоптозов при обработке как 50 мкМ, так и 100 мкМ Q10. Результаты представлены на фигурах 1-6.

Для того чтобы получить дополнительное подтверждение, что воздействие Q10 приводит к апоптозному ответу у HepG2 раковых клеток печени, второе апоптозное исследование было оценено с использованием основанного на ApoStrand™ ELISA метода, где подсчитывались однонитевые ДНК. The ApoStrand™ ELISA основывается на чувствительности ДНК в апоптозных клетках к денатурации формамидом и на детекции денатурированных ДНК моноклональными антителами к однонитевым ДНК (онДНК). Обработка раковых клеток печени линии HepG2 50 и 100 мкМ Q10 привела к детектируемым апоптозам, с дозозависимым ответом в 17% и 32%, соответственно (фигура 7). Эти результаты совпадают с наблюдением индуцированных Q10 апоптозов в других линиях раковых клеток из других тканей (напр., SCC, SKMEL-28, MCF-7, и PC-3).

ПРИМЕР 4: Протеомический анализ клеток, обработанных Q10

Клеточный осадок образцов, обработанных Q10, был анализирован с использованием протеомичеких методов. Клеточные осадки были лизированы и обработаны с использованием 2-D геля и иммуноблоттинга. Три клеточных типа (SKMEL-28, SCC, и nFib) были обработаны Q10 и подвергнуты протеомитической характеристике путем 2-D гель электрофореза.

Протеометический анализ SKMEL-28 клеток, обработанных Q10

В первой экспериментальной серии, проведенной и оцененной путем иммуноблоттинга и 2-D гель электрофореза, участвовала линия клеток рака кожи SKMEL-28. Эта экспериментальная серия включала SK-MEL-28 клетки, обработанные 3, 6, 12 и 24 часа 0, 50 или 100 мкМ Q10.

Обработанные Q10 образцы SK-MEL-28 были подвергнуты 2-D гель электрофорезу (Фигура 8) и анализировались на идентификацию изменений в концентрациях белка по сравнению с контрольными образцами. Был проведен сравнительный анализ 943 точек в двадцати четырех гелях, где сравнивались контрольный образец и все обработанные образцы. Анализы включали идентификацию изменений на точках во времени, из-за возрастания, снижения или пост-трансляционной модификации.

Анализы обнаружили тридцать два статистически достоверно различимых точечных изменений. По ним двадцать статистически неопределимых точки были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипином и масс-спектрометрии. Охарактеризованные пептиды были найдены в белковой базе данных с помощью аналитической программы Mascot и MSRAT для идентификации белков (Таблица 2).

Таблица 2. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на обработку Q10 в клетках SKMEL-28.

Время (ч)	Q10 Конц. (мкМ)	2D точка #	Экспрессия	Разница	Белок	Название	Тип
3	50	528	понизилась	1,234	Катепсин D	CTSD	пептидаза
3	50	702	понизилась	1,575	Шаперонин содержащий TCP1, субъединица 3	CCT3	другое
3	50	74	понизилась	1,383	Фактор инициации трансляции эукариот 3	EIF3G	регулятор трансляции
3	50	829	понизилась	1,074	Рибосомальный белок P2	RPLP2	другое
3	50	368	понизилась	1,121	Трансальдолаза 1	TALDO1	фермент
6	50	452	возросла	-1,464	Фактор инициации трансляции эукариот 6	EIF6	регулятор трансляции
6	50	175	возросла	-1,32	Стоматин; HSPC322	STOM	другое
6	50	827	возросла	-1,457	Тирозин 3/Триптофан 5-монооксигеназы активации белок	YWHAZ	фермент
6	50	139	возросла	-1,628	Виментин	VIM	другое
6	50	218	возросла	-1,416	Виментин	VIM	другое
6	50	218	возросла	-1,212	Виментин	VIM	другое
6	50	139	возросла	-1,036	Виментин	VIM	другое
6	50	507	понизилась	1,379	Ламин B1	LMNB1	другое
6	50	571	понизилась	1,832	Рецептор импорта в митохондрии Tom22	TOMM22	транспортер
12	50	166	возросла	-1,171	ALG-2 интерактивный белок 1	PDCD6IP	другое
12	50	550	возросла	-1,747	Пептидилпролил изомераза A	PPIA	фермент
12	50	613	понизилась	1,802	Галецин-1	LGALS1	другое
12	50	242	понизилась	1,373	Фосфоглицерат мутаза; фосфоманномутаза 2	PGAM2	фосфатаза
24	50	326	понизилась	1,385	глицил-tРНК синтаза	GARS	фермент
24	50	419	понизилась	1,451	Гомолог Mago-nashi	MAGOH	другое
3	100	528	понизилась	-1,036	Катепсин D	CTSD	пептидаза
3	100	702	понизилась	1,151	Шаперонин содержащий TCP1, субъединица 3	CCT3	другое
3	100	74	понизилась	1,122	фактор инициации трансляции эукариот 3	EIF3G	регулятор трансляции
3	100	829	понизилась	1,145	Рибосомальный белок P2	RPLP2	другое
3	100	368	понизилась	1,209	Трансальдолаза 1	TALDO1	фермент
6	100	139	возросла	-1,829	Виментин	VIM	другое
6	100	218	возросла	-1,761	Виментин	VIM	другое
6	100	452	понизилась	1,134	фактор инициации трансляции эукариот 6	EIF6	регулятор трансляции
6	100	252	понизилась	1,4	Sec 13 белок, Кератин II	?	
6	100	827	понизилась	1,12	Тирозин 3/Триптофан 5-монооксигеназы активации белок	YWHAZ	фермент
12	100	76	возросла	-1,679	галецин-1; кератин II	LGALS1	другое

Ключевой находкой этого эксперимента было уменьшение трансальдолазы 1, что поддерживает предположение, что Q10 действует, изменяя метаболический статус внутри раковой клетки. Трансальдолаза 1 – фермент в пути пентозофосфата (также известного как гексомонофосфатный шунт). Трансальдолаза (EC:2.2.1.2) катализирует обратимый перенос трехуглеродной кетольной единицы с седогептулозы 7-фосфата на глицеральдегид 3-фосфат для формирования эритрозы 4-фосфата и фруктозы 6-фосфата. Этот фермент, вместе с

транскетолазой, осуществляет связь между гликолитическим и пентозофосфатным путями. Это важно для синтеза нуклеотидов и синтеза НАДФН, для содействия образованию восстанавливающих эквивалентов для биосинтетических реакций и для поддержания восстановительной среды.

Недавняя публикация (Basta, P., et.al. August 2008, Cancer Detect Prevention, 32, 200-208) предоставила доказательство генетического полиморфизма трансальдолазы и была связана с плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Другая недавняя публикация (Qian, Y., et.al. May 2008, Biochem J, 415, 123-134) идентифицировала отсутствие трансальдолазы как модулятор митохондриального гомеостаза, потока Ca^{2+} и апоптозов.

По этим первичным результатам другие белки, идентифицированные путем 2-D гель-электрофореза как модулированные Q10 в SK-MEL-28, были анализированы по известным связям (фигура 9). Функциональная оценка этих белков показала, что существует группа, участвующая в 14-3-3-опосредованном сигналинге (PDCP6IP, YWHAZ и VIM), наряду с отдельными белками, связанными со множеством процессов [клеточный цикл; пентозофосфатный путь (TALDO1); церамид сигналинге (CTSD); аминоацил-тРНК биосинтезе (GARS) и импорте белков в митохондрии (TOM22)].

Протеомический анализ SCC клеток, обработанных Q10

Другая линия клеток рака кожи, плоскоклеточная карцинома (SCC), также была подготовлена и проанализирована путем 2-D гель-электрофореза, как в предыдущем эксперименте по анализу SK-MEL-28. SCC клетки были обработаны 100 мкМ Q10 в течение 6 часов или 24 часов до сбора. Были взяты также контрольные необработанные клетки. Клеточный осадок был лизирован, и образцы были подвергнуты 2-D электрофорезу (дважды на точку). Были проведены анализы шести сотен белковых точек в сравнительном исследовании, где контрольный образец сравнивался с шестичасовым и двадцатичетырехчасовым воздействием.

Верхние двадцать пять статистически достоверно различимых изменений на точках были оценены путем сравнительного анализа в 2-D электрофорез-геле. По ним двадцать точек были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипсином и масс-спектрометрии (результаты представлены в Таблице 3 ниже).

Таблица 3. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на 100 мкМ обработку Q10 в клетках SCC на 6 и 24 часах.

Точка #	**Белок**	**Название**	**Клеточная локализация**	**Функция**	**Реакция (кратное изменение)**
331	Трансальдолаза 1	TALDO1	Цитоплазма	Фермент	Уменьшение (1,5) на 6 и 14 ч
23	Человеческий BSCv (хромосома 20 рамка считывания 3)	C20ORF3	Плазматическая мембрана	Стриктозидин синтаза	Уменьшение (2,1) на 6 и 24 ч
54	NM23 белок	NME1	Ядро, (митохондрии?)	Киназа	Увеличение (-1,2) на 6 ч, уменьшение на 24 ч
116	Два человеческих ESTs из MCF7 клеточной линии рака молочной железы (HSP 70)			HSP70	Уменьшение (2,6) на 6 ч, последующее уменьшение на 24 ч
176	белок 1 теплового шока 27кДа	HSPB1	Цитоплазма	Ответ на внешний стресс	Увеличение (-1,9) на 6 и 24 ч
135	Кератин I	KRT1	Цитоплазма	Промежуточные филаменты	Уменьшение (2,3) на 6 и 24 ч
50	Кератин 14	KRT14	Цитоплазма	Промежуточные филаменты	Увеличение (-1,6) на 6 и 24 ч
68	Кератин 13	KRT13	Цитоплазма	Промежуточные филаменты	Увеличение (-1,5) на 6 и 24 ч
49	Протеасома Бета 7	PSMB7	Цитоплазма	СУБЪЕДИНИЦА протеасомы	Уменьшение (1,6) только на 24 ч
93	Субъединица 3 активатора протеасомы	PSME3	Цитоплазма	Пептидаза	Уменьшение (1,3) только на 24 ч
66	Rho GDP диссоциации ингибитор (GDI) альфа	ARHGDIA	Цитоплазма	Ингибитор	Уменьшение (1,5) только на 6 ч
1	Неизвестен?				Уменьшение (9,5)

Трансальдолаза 1: Как наблюдалось ранее у SKMEL-28 клеток, обработанных Q10, фермент трансальдолаза 1 был модулирован с уменьшением в

концентрациях. Это дает независимое от предыдущего наблюдения подтверждение связи между Q10 и перестройками в трансальдолазе (и таким образом в метаболическом статусе клетки).

Трансальдолаза – фермент неокислительной фазы пентозофосфатного пути. (фигура 10). Пентозофосфатный путь является ключевым моментом в метаболическом статусе клетки для образования никотинамидадениндинуклеотидфосфата (восстановленного НАДХ), для восстановительного биосинтеза и для образования рибозы, которая является необходимым компонентом АТФ, ДНК и РНК. Трансальдолаза также связывает пентозофосфатный путь с гликолизом. Гликолиз – метаболический путь, по которому раковые клетки получают энергию, необходимую для поддержания жизни клетки, если митохондриальный процесс окислительного фосфорилирования не задействован. Q10 является необходимым коэнзимным фактором, требующимся для окислительного фосфорилирования и образования АТФ в митохондриях.

BSCv: Точка 23 была новым белком человека из Хромосомы 20, названным BSCv. BSCv белок также известен как связанный с плазматической мембранов адипоцитов белок (названия генов: APMAP или C20orf3) и предполагается, что он является мембранным белком типа II с последовательностью, подобной белковому семейству синтаз стриктозидина. Обработка Q10 приводит к уменьшению концентраций этого белка. Этот белок не очень хорошо охарактеризован, и его гомология с стриктозидин синтазами не подвержена. Интересно, что этот белок связывается с ролью в дифференциации адипоцитов (Albrektsen et al., 2001). Недавние протеомические исследования человеческой сальниковой жировой ткани идентифицировали BSCv как один из девяти белков с различной экспрессией при поликистозном синдроме яичников (ПКСЯ) у страдающих ожирением женщин (Corton, 2008 Hum. Reprod. 23: 651-661). Поскольку он является белком клеточной оболочки, который реагирует на Q10, антитело к BSCv было бы полезно и как биомаркер. На основании настоящих результатов и доступной литературы, BSCv потенциально может играть роль при раке и диабете.

NM23A: Неметастатических клеток 1, белок (NM23A, также известный как NME1), считающийся метастатическим супрессором. Этот ген (NME1) был

идентифицирован, поскольку уровни его мРНК транскриптов падают в высоко метастазирующих клетках. Белок обладает активностью как нуклеозид дифосфат киназа (НДК) и существует как гексамер, состоящий из 'A' (кодирумой этим геном) и 'B' (кодируемой NME2) изоформ. Мутации по этому гену идентифицированы в агрессивных нейробластомах. Активность NDK поддерживает равновесие между концентрациями различных нуклеозидтрифосфатов, как, например, при превращении GTP, образующегося в цикле лимонной кислоты (Кребса), в АТФ. Комплекс NDK связывается с p53 через взаимодействие с STRAP. Следует заметить, что STRAP связан с HNF4A. Таким образом, NM23A является потенциальным белком, участвующим в путях, важных для клеточного контроля и лечения болезни.

Rho GDP диссоциации ингибитор (GDI) альфа: GDI регулирует GDP/GTP обменную реакцию Rho белков путем ингибирования диссоциации GDP от них, и последующего связывания GTP с ними. Белок показывает положительную регуляцию в раковых клетках.

ПРИМЕР 5: Анализы митохондриального обогащения

Доказательства по нескольким линиям подвердили, что оценка тесной связи роли митохондриальных белков и биологии рака и реакции на Q10 является достоверной. Во-первых, Q10 в процессах митохондриального окислительного фосфорилирования для образования энергии в нормальных клетках играет необходимую роль. Однако метаболическое переключение, которое происходит в раковых клетках, приводит к тому, что энергия образуется по альтернативному пути гликолиза, не требующем Q10. Во-вторых, апоптозный ответ клеток требует наличия митохондриальных белков. Установлено, что Q10 стимулирует апоптозы в раковых клетках (семейство белков Bcl-2, цитохром c). Наконец, новые митохондриальные белки идентифицированы как модулированные воздействием Q10, что показано изменением уровня белка в митохондриях при импорте рецепторного белка TOM22 (см. эксперименты, описанные здесь).

Получение богатых митохондриями образцов

Клетки рака кожи SKMEL-28 были обработаны 100 мкМ Q10 или пустым раствором в течение 6, 19 или 48 часов. Клетки были собраны путем промывки и

соскабливания клеток с T-160 колб (4 на каждую временную точку). Клетки были собраны путем центрифугировании, и осадок был заморожен и хранился при -80 °C. Клеточный осадок был ресуспендирован и разрушен с использованием 2 мл гомогенизатора Dounce. Реагенты и способы были получены из набора для выделения митохондрий для культивируемых клеток (MitoSciences, Cat# MS852). Получившиеся в результате образцы митохондрий были разделены на 75 мкл аликвоты (4-5 аликвот на образец) и хранились при -80 °C.

Протеомический анализ богатых митохондриями образцов, выделенных из SK-MEL-28 клеток, обработанных Q10

2-D гель-электрофорез был осуществлен на белках, растворенных из двух аликвот SK-MEL-28 богатых митохондриями образцов, обработанных 100 мкМ Q10 в течение 6, 19 и 48 часов (одновременно с соответствующими обработанными пустым раствором контролями). Образцы были подвергнуты 2-D электрофорезу (дважды на каждой точке). Были проведены анализы 525 белковых точек в сравнительном исследовании, где контрольный образец сравнивался с образцами других временных точек (фигура 11).

Девять статистически достоверно различимых изменений на точках были выбраны для сравнительного анализа в 2-D электрофорез-геле. По ним 9 точек были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипсином и масс-спектрометрии.

Таблица 4. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на обработку Q10 в SKMEL-28 митохондриях.

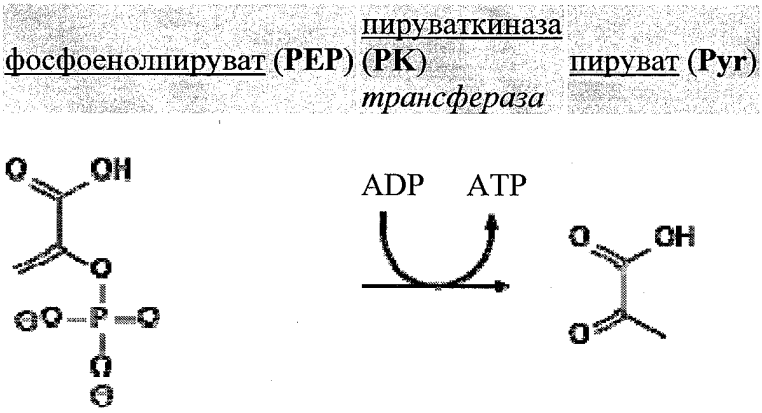
Spot #	Белок	Название	Функция	Реакция (кратное изменение)
11	Неизвестный белок	?	?	Повышение (1?3) на 6 ч, после этого снижение на низкие уровни
131	Неизвестен, такой же как на точке #11, модифицированный	?	?	Понижение (1?3) на 6 ч, еще более сильное снижение на 19 и 48 ч
279	ацил-CoA тиоэстеразы 7 изоформа hBACHb	ACOT7	Расщепление жирных ацил-CoA на свободные жирные кислоты и CoA	Понижение (1?3) на 6 ч, возвращение к норме на 48 ч
372	Пируват киназа	PKM2	Катализ образования фосфоенолпирувата из пирувата и ATP	Повышение (1?5) на 6 ч, возвращение к норме на 48 ч
110	Белок er60	PDIA3	Белок дисульфид изомераза	Повышение на 19 и 48 ч
185	Кератин 10	KRT10	Промежуточный филамент	Повышение только на 19 ч
202	Бета-Актин		Структурный белок	Повышение только на 19 ч
246	Малектин	MLEC	Углевод-связывающий белок эндоплазматического ретикулума и возможный участник ранних этапов белкового N-гликозилирования	Повышение только на 19 ч
75	Биспиральный домен, содержащий 58	CCDC58	Консервативный гипотетический белок – формирование пор ядра	Повышение на 48 ч

Ацил-CoA тиоэстераза 7: Ацил-CoA тиоэстераза 7 (ACOT7) является членом энзимного семейства, которое катализирует гидролиз жирного ацил-CoA в свободную жирную кислоту и CoA. Этот фермент таким образом играет роль в регуляции липидного метаболизма и клеточного сигналинга. ACOT7 связан с длинноцепочечными ацил-CoA субстратами с цепями жирных кислот, состоящими из 8-16 атомов углерода (C8-C16). Точная функция ACOT7 в клетке понятна не до конца. Транскрипция этого гена активируются связывающим стерол

регуляторный элемент белком 2, что подтверждает его функцию в метаболизме холестерина.

Результаты этого примера показывают, что ACOT7 потенциально участвует в метаболизме Q10, прямо или косвенно. Таким образом, целевая ACOT7 может содействовать модуляции внутриклеточных уровней Q10 и тем самым влиять на клеточные эффекты Q10.

Пируваткиназа: Пируваткиназа – фермент, участвующий в последнем этапе гликолиза. Он катализирует перенос фосфатной группы с фосфоенолпирувата (PEP) к АДФ, производя одну молекулу пирувата и одну молекулу АТФ.



Белком предположительно является PKM2, изоформа типа 2, которая была идентифицирована в богатом митохондриями образце SK-MEL-28. Хорошо известно, что эта изоформа участвует в образовании и регуляции опухолевых клеток.

Подсчет уровней Q10 в митохондриях

Способ одновременного определения коэнзима Q10 (Q10) и восстановленной формы убихинола-10 (Q10H2) был выполнен на основе недавно опубликованного способа (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175, 242-248) благодаря использованию LC–MS/MS с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме определения положительных ионов. Возможны высоко избирательная идентификация и чувствительный подсчет Q10 и Q10H2, вкупе с идентификацией других выбранных липидов. Аликвоты богатых митохондриями образцов из SK-

MEL-28, обработанных 100 мкМ Q10, были подвергнуты стандартной пре-обработке, основанной на осаждении белка, экстракции жидкость–жидкость, выпаривании до высыхания и восстановлению в 50 мкл смеси 95:5 метанол/гексан (по объему).

В этом анализе были подсчитаны Q10, Q10H2 и Q9 (таблица 5). Уровни соответствующей молекулы Q9 были низкими, и близко от уровня детекции. Уровни необработанных образцов были сравнительно постоянными, с 6 часами обработанным Q10 образцом, имеющим тот же уровень. Для контроля за вариабельностью материала образцов были подсчитаны также уровни холестерина для подтверждения того, что различия не происходят вследствие погрешностей в размере образцов. Когда уровни Q10 были верными по сравнению со значениями общего белка, наблюдаемого в белковой экстракции других аликвот из тех же митохондриальных проб, сравнительные соотношения были сопоставимыми. Таким образом, достоверное возрастание уровней Q10 наблюдалось на 19 часах (~в 3 раза), с даже большим возрастанием на временной точке 48 часов (~ в 6 раз) (фигура 12).

Таблица 5. HPLC-MS Результаты количественного определения уровней Q10, присутствующего в богатых митохондриями образцах из SK-MEL-28 клеток, обработанных 100 мкМ Q10 в среде.

			Площадь пика		нг/образец			мкг/образец
Файл	Образец	Инъекция	Q9	Q10	Q9	Q10	$Q10H_2$	Холестерол
081204-05	100 нг Std		245,342	352792				
081204-06	6 ч контроль#1	10%	2560	32649	1.04	9.25		
081204-07	Холостой раствор#1	5 ul	3781	3174	1.54	0.9		
081204-08	Холостой раствор#2	5 ul	2396	4399	0.98	1.25		
081204-09	6 ч контроль#2	20%	1572	36328	0.64	10.3		
081204-10	Холостой контроль#3	10 ul	1722	2504	0.7	0.71		
081204-11	48 ч Q10 обработ.	20%	4879	164496	1.99			13.86
081204-12	48 ч контроль	20%	2412	25552	0.98	7.24		13.04
081204-13	6 ч Q10 обработ.	20%	692	25427		7.21		
081204-14	19 ч Q10 обработ.	20%	1161	59164		16.77		
081204-15	19 ч контроль	20%	901	19999		5.67		

Неожиданным результатом этого исследования было обнаружение того, что Q10 попадал в клетки в окисленной форме. Для 48-часовых образцов восстановленная форма Q10H2 также была подсчитана, и было обнаружено, что она присутствует в достоверно более низких количествах (0,28 нг/образец

CoQ10H2 по сравнению с 46,63 нг/образец CoQ10). Было общее возрастание (в 3 раза) в уровнях Q10H2 в обработанном Q10 48-часовом образце, хотя уровни были близкими к предполагаемому порогу чувствительности способа. Интересно, что окисленная форма (Q10) может действовать как прооксидант в биологических системах. В соответствии с литературой, когда человеческая плазма была оценена по Q10 и Q10H2, было обнаружено, что большинство (90%) молекул присутствуют в восстановленной форме Q10H2 (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175, 242-248), которая может действовать как антиоксидант.

Таким образом, эти результаты подтверждают и дают количественную оценку того, что уровни Q10 возрастают в митохондриях после экзогенного добавления Q10 в среду. Неожиданным открытием было то, что Q10 оставался в той же окисленной форме (про-оксидант), в которой его добавили, и не превращался в восстановленную (анти-оксидант) форму Q10H2 в каком-либо значительном количестве.

ПРИМЕР 6: Анализы ПЦР в режиме реального времени

Эксперимент 1: Апоптозный анализ

Как обсуждалось в примере 3, обработка раковых клеток Q10 вызывает гибель части этих клеток вследствие апоптозных процессов. Чтобы идентифицировать белки, задействованные в реакции на Q10, были применены методы полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (RT-ПЦР) для идентификации изменений в уровнях мРНК для генов/белков, включенных в целевые пути, связанные с апоптозом.

При использовании ПЦР методов как скринингового механизма, оценивался спектр целевых молекул, которые потенциально предлагались как способные отвечать на биологическое действие Q10 внутри клеток. Изменения в уровнях мРНК были оценены с использованием количественных оценок ПЦР в режиме реального времени для определения уровней мРНК в отобранных заранее подсериях, содержащих 80 специфических целевых путей.

Для интерпретации мРНК результатов, идентифицировались и оценивались гены, у которых в два раза изменялась транскрипция их мРНК. Уровень генной транскрипции для образования мРНК дает только грубую оценку потенциальных

изменений в уровне экспрессируемого белка. Специалисты в данной области поймут, что каждая мРНК может иметь различные степени, в какой она деградирует или в какой ее трансляция неэффективна, поэтому в результате будут получаться различные количества белка.

SkBr-3 клетки, обработанные 50 мкМ Q10 24 часа

Способ анализа RT-ПЦР был использован для количественного определения изменений уровней мРНК для всех 84 белков, связанных с апоптозным путем. Эксперименты с апоптозным анализом ПЦР в режиме реального времени на SkBr3 с Q10 (24 ч) показали, что влияние было оказано на следующие мРНК: Bcl2, Bcl2L1, Bcl2L11, Birc6, Bax, Xiap, Hprt1, Apaf1, Abl1, Braf. Эти результаты также предоставили доказательства того, что обработка Q10 вызывает апоптозный ответ в раковых клетках.

Таблица 6А

Обозначение	Положительная-Отрицательная регуляция	Unigene	Refseq	Описание	Название гена
BCL2L1	13.1957	Hs.516966	NM_138578	BCL2-подобный 1	BCL-XL/S
BNIP2	6.3291	Hs.646490	NM_004330	BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 2	BNIP-2/NIP2
BCL2	5.4717	Hs.150749	NM_000633	В-клетки CLL/лимфома 2	Bcl-2
BIRC6	4.7966	Hs.150107	NM_016252	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 6 (аполлон)	APOLLON/BRUCE
BCL2L11	4.6012	Hs.469658	NM_006538	BCL2-подобный 11 (содействие апоптозам)	BAM/BIM
XIAP	4.3832	Hs.356076	NM_001167	X-связанный ингибитор апоптозов	API3/BIRC4
BRAF	4.3832	Hs.550061	NM_004333	гомолог B1 вирусного онкогена мышиной саркомы V-raf	B-raf 1/BRAF1
BAX	3.896	Hs.631546	NM_004324	BCL2-связанный X белок	Bax zeta
APAF1	2.6244	Hs.708112	NM_001160	Фактор 1, активирующий апоптозную пептидазу	CED4/DKFZp781B1145
HPRT1	-160.6748	Hs.412707	NM_000194	Гипоксантин Фосфорибозилтрасфераза 1 (синдром Леш-Нихана)	HGPRT/HPRT

Согласованные результаты трех независимых экспериментов на SK-MEL-28 клетках представлены ниже в таблице 6B. В SCC клетках многие гены также регулируются обработкой 100 мкМ Q10. Гены в апоптозном анализе, которые по видимости регулируются в SCC клетках, описаны в таблице 7. Мы обнаружили, что многие гены регулируются на 6 часах, как в SK-MEL-28 клетках, так и в SCC клетках. На 24 часах регуляция уменьшается. Гены которые по видимости регулируются как в SK-MEL-28 клетках, так и в SCC клетках, описаны в таблице 8.

Таблица 6B. Гены в клетках SK-MEL-28, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10, при анализе апоптозным анализом.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция**	**Локализация**	**Возможные функции**
ABL1	C-abl онкоген 1, рецептор тирозинкиназы	Отрицательно регулируется на 72 часах	Ядро	Тирозинкиназа
BAG1	BCL2-ассоциированный атероген	Положительно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Анти-апоптоз, путь рецептора глюкокортикоида
BCL2	B-клетки CLL/лимфома 2	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Гибель клеток
BCL2A1	BCL2-связанный белок A1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Регулятор каспаз, фосфорилирование TP73
BCL2L1	BCL2-подобный 1	Отрицательно регулируется на 72 часах	Цитоплазма	Ингибитор каспаз
BCL2L10	BCL2-подобный 10 (содействие апоптозам)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Активатор каспаз
BCL2L11	BCL2-подобный 11 (содействие	Отрицательно регулируется на	Цитоплазма	Про-апоптоз, активатор каспазы

	апоптозам)	48 часах		3
BIRC3	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3	Отрицательно регулируется на 6 часах	Цитоплазма	Анти-апоптоз
BIRC8	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 8	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Активатор каспаз
CARD8	Семейство поддерживающего каспазы домена, член 8	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Активатор каспаз
CASP14	Каспаза 14, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Связанная с апоптозами цистеинпептидаза
CASP5	Каспаза 5, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Связанная с апоптозами цистеинпептидаза
CD40LG	CD40 лиганд (TNF суперсемейство, член 5, гипер-IgM синдром)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Внеклеточное пространство	Связывание рецептора CD40
CIDEA	DFFA-подобный эффектор а, вызывающий клеточную гибель	Положительно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Про-апоптоз
FADD	Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели	Отрицательно регулируется на 6 часах	Цитоплазма	Про-апоптоз
FAS	Суперсемейство рецепторов Fas (TNF , член 6)	Положительно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Про-апоптоз
FASLG	Fas лиганд	Отрицательно	Внеклеточ	Про-апоптоз

	(суперсемейство TNF, член 6)	регулируется на 48 часах	ное пространство	
GADD45A	Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа	Положительно регулируется на 48 часах	Ядро	Задержка роста
HRK	Harakiri, BCL2 взаимодействующий белок (содержит только BH3 домен)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Про-апоптоз
PYCARD	PYD и CARD домен содержащий	Отрицательно регулируется на 6 часах	Цитоплазма	Активатор апоптозной протеазы
TNF	Фактор некроза опухолей (суперсемейство TNF, член 2)	Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется	Внеклеточное пространство	Связывание TNF рецептора
TNFRSF10A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10a	Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется	Плазматическая мембрана	Активатор каспаз
TNFRSF10B	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10b	Отрицательно регулируется на 72 часах	Плазматическая мембрана	p53 сигналинг, активатор каспаз.
TNFRSF1A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A	Отрицательно регулируется на 72 часах	Плазматическая мембрана	Про-апоптоз

TNFRSF21	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 21	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Активатор каспаз
CD27	CD27 молекула	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Ингибитор каспаз
TNFRSF9	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 9	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Про-апоптоз
TNFSF10	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10	Положительно регулируется на 48 часах	Внеклеточное пространство	Про-апоптоз
TP73	Опухолевый белок p73	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Фактор транскрипции
TRAF3	TNF рецептор-связанный фактор 3	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Домен «цинковых пальцев»
TRAF4	TNF рецептор-связанный фактор4	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Домен «цинковых пальцев»

Таблица 7. Гены в SCC клетках, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10, при анализе апоптозным анализом.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция**
AKT1	Гомолог 1 вирусного онкогена мышиной тимомы V-akt	Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах.
BAG4	BCL2-ассоциированный атаноген 4	Положительно регулируется на 24 часах.
BAX	BCL2-ассоциированный X белок	Положительно регулируется на 24 часах.
BCL2	B-клеток CLL/лимфома 2	Положительно регулируется на 24 часах.
BCL2L1	BCL2-подобный 1	Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах.
BIRC3	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3	Отрицательно регулируется на 6 часах.
BNIP3	BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3	Отрицательно регулируется на 24 часах.
CARD6	Семейство поддерживающего каспазы домена, член 6	Отрицательно регулируется на 6 часах.
CASP6	Каспаза 6, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	Положительно регулируется на 24 часах.
CASP7	Каспаза 7, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	Положительно регулируется на 24 часах.
CD40	CD40 молекула, суперсемейство TNF рецепторов, член 5	Отрицательно регулируется на 6 часах.
FADD	Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели	Положительно регулируется на 24 часах.
GADD45A	Задержка роста и индуцирование	Положительно регулируется

	повреждения ДНК, альфа	на 24 часах.
HRK	Harakiri, BCL2 взаимодействующий белок (содержит только BH3 домен)	Положительно регулируется на 24 часах.
TNFRSF21	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 21	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TNFRSF25	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 25	Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах.
CD27	CD27 молекула	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TNFRSF9	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 9	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TNFSF10	Фактора некроза опухолей (лиганд) суперсемейство, член 10	Положительно регулируется на 24 часах.
CD70	CD70 молекула	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TP53	Опухолевый белок p53	Положительно регулируется на 24 часах.
TP73	Опухолевый белок p73	Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах.
TRAF2	TNF рецептор-ассоциированный фактор 2	Положительно регулируется на 24 часах.

Таблица 8. Гены апоптозного анализа, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10 и в SK-MEL-28, и в SCC клетках.

Обозначение	**Описание**
BCL2	B-клеток CLL/лимфома 2
BCL2L1	BCL2-подобный 1 (Bcl-xl)
BIRC3	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3
FADD	Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели
GADD45A	Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа
TNFRSF21	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 21
CD27	CD27 молекула
TNFRSF9	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 9
TNFSF10	Фактора некроза опухолей (лиганд) суперсемейство, член 10
TP73	Опухолевый белок p73
TRAF2	TNF рецептор-ассоциированный фактор 2

Интересно, что измененные уровни мРНК показали значимую положительную регуляцию в сериях апоптозных белков, где Bcl-xl был выше всего. Это также наблюдалось в экспериментах анализа белка на SK-MEL-28 клетках.

Bcl-xl является трансмембранной молекулой в митохондриях (Bcl-xl является обозначением "базальноклеточная сверхбольшая лимфома»). Она включена в сигнальный путь трансдукции FAS-L и является одним из нескольких антиапоптозных белков, которые являются членами белкового семейства Bcl-2. Она задействована в выживании раковых клеток. Однако известно, что альтернативный сплайсинг Bcl-x мРНК человека может приводить, по меньшей мере, к двум различным видам Bcl-x мРНК, Bcl-xL и Bcl-xS. Преобладающий белковый продукт (233 аминокислоты) – более крупная Bcl-x мРНК, Bcl-xL, которая подавляет клеточную гибель вследствие удаления фактора роста (Boise et al., 1993 . Cell 74, 597-608). Bcl-xS, а с другой стороны, ингибирует возможность

Bcl-2 ингибировать клеточную гибель и делает клетки более восприимчивыми к апоптозной гибели клеток. Используемые анализы не различают, какая изоформа является положительно регулируемой. Bcl-x изоформа, которая положительно регулируется CoQ10 в этих исследованиях, может быть определена обычными способами, известными специалистам, напр., использованием RT-ПЦР способов для оценки соотношения двух изоформ мРНК сплайсинга (Bcl-xL vs Bcl-sL).

Из наблюдения связанных с апоптозом белков было замечено, что множественные про- и анти-апоптозные факторы в BCL-2 семействе или взаимодействие с этими факторами модулировали уровни экспрессии (BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). Эти белки управляют проникновением через мембраны митохондрий.

Ранний маркер апоптозного ответа наблюдался вместе с положительной регуляцией Каспазы-9 (16 часов), что согласуется с предыдущими наблюдениями апоптозов с каспазой 3/7 белков. Индукция стресс-сигналинг путей приводит к высвобождению циторохрома с из митохондрий и активации apaf-1 (апоптосомы), которая в свою очередь расщепляет про-энзимы каспазы-9 в активную форму. После инициации каспаза-9 начинает расщеплять прокаспазу-3 и прокаспазу-7, запуская дополнительные апоптозные пути.

Семейство рецепторов к фактору некроза опухолей также постоянно имеет отношение к модулированным белкам.

Замечена также сильная отрицательная регуляция опухолевого белка p73. Анализы множества опухолей, обычно находимых у человека, включая рак молочной железы и яичников, показали высокую экспрессию p73 по сравнению с нормальными тканями в соответствующих областях. Недавние открытия подтверждают, что дерегулируемая сверхэкспрессия транскрипционных факторов в организме, участвующих в регуляции клеточного цикла и синтезе ДНК в клетках млекопитающих (напр., E2F-1), вызывает экспрессию p73. Это подтверждает, что p73 может быть онкобелком, но может быть задействован в различных механизмах, которые связаны с p53 белком. На Фигуре 13 представлена схема апоптозного пути.

Клетки SKMEL-28

Из наблюдения связанных с апоптозом белков было замечено, что множественные про- и анти-апоптозные факторы в BCL-2 семействе или

взаимодействие с этими факторами модулировали уровни экспрессии (BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). Эти белки управляют проникновением через мембраны митохондрий.

Ранний маркер апоптозного ответа наблюдался вместе с положительной регуляцией каспазы-9 (16 часов), что согласуется с предыдущими наблюдениями апоптозов с каспазой 3/7 белков. Индукция стресс-сигналинг путей приводит к высвобождению циторохрома с из митохондрий и активации apaf-1 (апоптосомы), которая в свою очередь расщепляет про-энзимы каспазы-9 в активную форму. После инициации каспаза-9 начинает расщеплять прокаспазу-3 и прокаспазу-7, запуская дополнительные апоптозные пути.

Таблица 9. Изменения в уровнях мРНК в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10, оцененных по RT-ПЦР анализам, сосредоточенным на апоптозных путях

справ. Посл.	**Описание**	**Обозначение**	**6 ч Q10**	**16 ч Q10**	**24 ч Q10**	**72 ч Q10**
NM_006538	BCL2-подобный 11 (содействие апоптозам)	BCL2L11	2,13	2,41	1,92	2,51
NM_000875	Инсулин-подобный рецептор фактора роста 1	IGF1R	1,77	1,09	1,33	1,25
NM_004048	Бета-2-микроглобулин	B2M	1,74	1,76	1,58	3,11
NM_003921	В-клеток CLL/лимфома 10	BCL10	1,55	1,87	1,48	-3,11
NM_004330	BCL2/аденовиру с E1B 19кДа взаимодействую щий белок 2	BNIP2	1,46	1,51	1,57	-1,61
NM_005157	C-abl онкоген 1, рецептор тирозин киназы	ABL1	1,42	2,77	-1,22	-2,03

NM_004323	BCL2-ассоциированный атаноген	BAG1	1,41	1,44	-1,61	-2,45
NM_001229	Каспаза 9, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	CASP9	1,32	3,96	1,83	1,14
NM_003806	Harakiri, BCL2 взаимодействующий белок (содержит только BH3 домен)	HRK	1,18	4,52	2,73	-1,14
NM_001924	Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа	GADD45A	1,07	3,34	1,13	-2,36
NM_001188	BCL2-антагонист/киллер 1	BAK1	1,06	2,73	-1,00	-4,54
NM_004295	TNF рецептор-связанный фактор 4	TRAF4	-1,91	2,63	-1,58	-740,66
NM_003842	Суперсемейство рецепоров факторов некроза опухолей, член 10b	TNFRSF10B	-2,07	1,53	-1,81	-710,49
NM_000633	B-клеток CLL/лимфома 2	BCL2	-2,98	-1,63	-2,82	-11,36
NM_001242	CD27 молекула	CD27	-3,40	-2,38	-1,35	-12,72
NM_014430	Клеточную гибель вызывающий	CIDEB	-3,48	1,56	-3,69	-2,59

	DFFA-подобный эффектор b					
NM_001065	Суперсемейство рецепоров факторов некроза опухолей, член 1A	TNFRSF 1A	-4,53	2,28	-3,30	1,22
NM_005427	Опухолевый белок p73	TP73	-4,66	-9,80	-8,71	-26,96
NM_003844	Суперсемейство рецепоров факторов некроза опухолей, член 10a	TNFRSF 10A	-4,84	-5,26	-4,33	-11,84
NM_138578	BCL2-подобный 1	BCL2L1	-4,94	-1,80	-6,17	-7,04
NM_001165	Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3	BIRC3	-13,68	-1,98	-2,42	-3,42

Семейство рецепторов к фактору некроза опухолей также постоянно имеет отношение к модулированным белкам.

Замечена также сильная отрицательная регуляция опухолевого белка p73. Анализы множества опухолей, обычно находимых у человека, включая рак молочной железы и яичников, показали высокую экспрессию p73 по сравнению с нормальными тканями в соответствующих областях. Недавние открытия подтверждают, что дерегулируемая сверхэкспрессия транскрипционных факторов в организме, участвующих в регуляции клеточного цикла и синтезе ДНК в клетках млекопитающих (напр., E2F-1), вызывает экспрессию p73. Это подтверждает, что p73 может быть онкобелком, но может быть задействован в различных механизмах, которые связаны с p53 белком.

Эксперимент 2: ПЦР в режиме реального времени. Анализы, использующие

наборы окислительного стресса и антиоксидантной защиты

Для идентификации белков, которые были включены в Q10 ответ, был использован метод полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (RT-ПЦР) для идентификации изменений в уровнях мРНК для генов/белков, включенных в целевые пути окислительного стресса и антиоксидантной защиты.

В таблице 10 ниже перечисляются гены, которые регулируются в SK-MEL28 клетки, обработанных 100 мкМ Q10. Результаты даются только для тех генов, которые являются регулируемыми в двух независимых экспериментах. Хотя существует достоверное количество генных регуляций, наблюдаемых на 6 часах, большинство достоверных изменений в уровнях РНК наблюдаются на 48 часах.

Таблица 10. Гены в SK-MEL-28 клетках, которые регулируются при обработке 100 мкМ Q10, что видно по анализам окислительного стресса и антиоксидантной защиты Arrays.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция**	**Локализация**	**Возможные функции.**
ALB	Альбумин	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Белок-носитель, анти-апоптозная
AOX1	Альдегид оксидаза 1	Положительная регуляция с 16 часов	Цитоплазма	Образование свободных радикалов, метаболизм ксенобиотиков
APOE	Аполипопротеин E	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Метаболизм липидов
ATOX1	ATX1 антиоксидантного белка 1 гомолог (дрожжи)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм меди
BNIP3	BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Анти-апоптоз

CSDE1	Домен холодового шока, содержащий E1, РНК-связывающийся	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Регуляция транскрипции
CYBA	Цитохром b-245, альфа полипептид	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Апоптозы
CYGB	Цитоглобин	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Пероксидаза, транспортер
DHCR24	24-дегидрохолистерин редуктаза	Отрицательная регуляция на 6 часах	Цитоплазма	Перенос электронов, связывание с TP53, участие в апоптозах
DUOX1	Двойная оксидаза 1	Положительная регуляция на 48 часах	Плазматическая мембрана	Связывание ионов кальция, перенос электронов.
DUOX2	Двойная оксидаза 2	Отрицательная регуляция на 48 часах	Неизвестна	Связывание ионов кальция
EPHX2	Эпоксида гидролаза 2, цитоплазматическая	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм арахидоновой кислоты
EPX	Эозинофил пероксидаза	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм фенилаланина, апоптозы.
GPX2	Глутатиона пероксидаза 2 (желудочно-кишечная)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Перенос электронов, связывание с TP53, участие в апоптозах
GPX3	Глутатиона пероксидаза 3 (плазма)	Положительная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Метаболизм арахидоновой кислоты, отрицательная регуляция в карциномах
GPX5	Глутатиона пероксидаза 5 (эпидидемальный андроген-связанный белок)	Положительная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Метаболизм арахидоновой кислоты.

GPX6	Глутатиона пероксидаза 6 (обонятельная)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Метаболизм арахидоновой кислоты.
GSR	Глутатиона редуктаза	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм глутамата и глутатиона, апоптозы
GTF2I	Общий фактор транскрипции II, i	Отрицательная регуляция на 6 часах	Ядро	Активатор транскрипции, транскрипция fos.
KRT1	Кератин 1 (эпидермолитический гиперкератоз)	Положительная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Связывание сахара
LPO	Лактопероксидаза	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Метаболизм фенилаланина
MBL2	Манноза-связывающий лектин (белок С) 2, растворимый (недостаток опсонина)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Дополнительный сигналинг, распознавание паттерна в рецепторах
МГST3	Микросомального глутатиона S-трансфераза 3	Положительная регуляция на 16 часах	Цитоплазма	Метаболизм ксенобиотиков.
MPO	Миелопероксидаза	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Анти-апоптоз, метаболизм фенилаланина
MPV17	MpV17 митохондриальный внутренний мембранный белок	Отрицательная регуляция на 6 часах	Цитоплазма	Поддержание митохондриальной ДНК.
MT3	Металлотионеин 3	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Связывание ионов меди.

NCF1	Нейтрофильный цитоплазматический фактор 1, (хронический гранулематоз, аутосома 1)	Отрицательная регуляция с 6 часах	Цитоплазма	Образование свободных радикалов
NCF2	Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 (65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2)	Положительная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Перенос электронов
NME5	Белок, экспрессирующийся в неметастазирующих клетках 5, (нуклеотид-дифосфат киназа)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Неизвестна	Метаболизм киназ, пуринов и пиримидинов
NOS2A	Оксида азота синтаза 2А (индуцируемая, гепатоциты)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Сигналинг рецептора глюкокортикоида, апоптозы
OXR1	Устойчивость к окислению 1	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Реакция на окислительный стресс
PDLIM1	PDZ и LIM домен 1 (elfin)	Положительная регуляция на48 часах	Цитоплазма	Активатор транскрипции
PIP3-E	Фосфоинозитид-связывающий белок PIP3-E	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Пероксидаза
PRDX2	Пероксиредоксин 2	Отрицательная регуляция на 6 часах	Цитоплазма	Роль в метаболизме фенилаланина. Роль в гибели клеток
PRDX4	Пероксиредоксин 4	Отрицательная регуляция с 24 часов	Цитоплазма	Тиоредоксин пероксидаза

PREX1	Фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфат-зависимый RAC 1	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Формирует окисленные свободные радикалы
PRG3	Протеогликан 3	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Роль в гибели клеток.
PTGS1	Простагландин-эндопероксид синтаза 1 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм арахидоновой кислоты, синтез простагландинов
PTGS2	Простагландин-эндоперокид синтаза 2 (простагландин G/H синтаза и циклоокигеназа)	Положительная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм арахидоновой кислоты, синтез простагландинов
PXDN	Пероксидаз гомолог (Drosophila)	Положительная регуляция на 48 часах	Неизвестна	Связывание с TRAF4, связывание ионов кальция, связывание ионов железа.
PXDNL	Пероксидаз гомолога (Drosophila)-подобный	Отрицательная регуляция на 48 часах	Неизвестна	пероксидаза, связывание ионов кальция, связывание ионов железа.
RNF7	Ring finger белок 7	Положительная регуляция на 16 часах	Ядро	апоптозы, связывание ионов меди, путь обмена убихинона
SGK2	Сыворотка/глюкокортикоид регулируемая киназа 2	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Киназа, регулятор каналов калия

SIRT2	Сиртуин (молчащего MAT-локуса информационной регуляции 2 гомолог) 2 (S. cerevisiae)	Положительная регуляция на 16 часах	Ядро	Фактор транскрипции
SOD1	Супероксиддисмутаза 1, растворимая (амиотрофический боковой склероз 1 (у взрослых))	Положительная регуляция на 16 часах	Цитоплазма	Апоптозы, активатор каспазы
SOD2	Супероксиддисмутаза 2, митоходриальная	Положительная регуляция на 16 часах	Цитоплазма	Апоптозы, регулируется TNF.
SOD3	Супероксиддисмутаза 3, внеклеточная	Отрицательная регуляция на 48 часах	Внеклеточное пространство	Про-апоптозное
SRXN1	Сульфиредоксина 1 гомолог (S. cerevisiae)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Связывание ДНК, оксидоредуктаза
TPO	Тиреоид-пероксидаза	Отрицательная регуляция на 48 часах	Плазматическая мембрана	Йодирование тироглобулина, метаболизм тирозина, метаболизм фенилаланина
TTN	Титин	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Актина цитоскелета сигналинг, интегрина сигналинг
TXNDC2	Тиоредоксин домен-содержащий 2 (сперматозоиды)	Отрицательная регуляция на 48 часах	Цитоплазма	Метаболизм пиримидинов

Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 (NCF2, 65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2) был одним из тех, чьи мРНК индуцировались вначале (наблюдалось на 6 часах). Впоследствии на временной точке 16 часов и дальше, после задержки на первичной фазе, индуцировались очень высокие уровни нейтрофильного цитоплазматического фактора (NCF1) (хронический

гранулематоз, аутосома 1).

Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 является цитоплазматической субъединицей мультибелкового комплекса, известного как НАДФН оксидаза, обычно находимая в нейтрофилах. Эта оксидаза вырабатывает множество супероксидов, которые попадают в полость нейтрофильной фагосомы.

НАДФН оксидаза (никотинамид аденин динуклеотид фосфатоксидаза) является связанным с мембраной энзимным коплексом. Ее можно обнаружить в плазматической мембране, а также в мембране фагосомы. Она состоит из шести следующих субъединиц:

а Rho гуанозин трифосфотаза (GTPаза), обычно Rac1 или Rac2 (Rac – обозначение для Rho-связанного C3 субстрата ботулинического токсина)

Пять "phox" единиц. (Phox – обозначение для фагоцитарной оксидазы)

- P91-PHOX (содержит гем)
- p22phox
- p40phox
- p47phox (NCF1)
- p67phox (NCF2)

Замечено, что уровни других НАДФН оксизад не изменились. Ферментом является NOX5, который является новой НАДФН оксидазой, вырабатывающей супероксиды и действующей как H+ канал (2+)-зависимым образом.

Кроме того, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат-зависимый RAC обменный агент 1(PREX1) также положительно регулировался. Этот белок действует как фактор обмена нуклеотида гуанина для RHO семейства маленьких GTP-связывающих белков (RACs). Показано, что он связывает и активирует RAC1 превращая связанный GDP в свободный GTP. Кодируемый белок, который находится в основном в цитоплазме, активируется фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом и бета-гамма субъединицами гетеротримерных G белков.

Вторым основным рано индуцированным белком была синтаза оксида азота 2A (индуцируемая, гепатоциты) (NOS2A). Оксид азота – реактивный свободный радикал, который действует как биологический медиатор в нескольких

процессах, включая нейротрансмиссию и антимикробную и антиопухолевую активность. Этот ген кодирует синтазу оксида азота, которая экспрессируется в печени и индуцируется комбинацией липополисахаридов и определенных цитокинов.

Супероксиддисмутаза 2, митохондриальная (SOD2) является членом семейства железо/марганец содержащих супероксиддисмутаз. Она кодирует митохондриальный белок, который формирует гомотетрамер и связывает один ион марганца на субъединицу. Этот белок связывает супероксидные побочные продукты окислительного фосфорилирования и превращает их в перекись водорода и двухатомный кислород. Мутации по этому гену связаны с идиопатической кардиомиопатией (ИКМП), преждевременным старением, спорадической болезнью двигательного нейрона и раком.

Примером отрицательной белковой регуляции является Forkhead box M1 (FOXM1), про которого известно, что этот белок играет ключевую роль в последовательности событий клеточного цикла, где пики эндогенной экспрессии FOXM1 наблюдаются на фазах S и G2/M. Недавние исследования показали, что FOXM1 регулирует экспрессию множества G2/M-специфичных генов, таких как Plk1, циклин B2, Nek2 и CENPF и играет важную роль в поддержании сегрегации хромосом и стабильности генома. FOXM1 ген в настоящее время известен как протоонкоген человека. Аномальная сверхрегуляция FOXM1 участвует в онкогенезе базальноклеточной карциномы (БКК). FOXM1 сверхрегуляцию позднее обнаружили в большинстве солидных раков человека, включая рак печени, молочной железы, легких, простаты, шейки матки, кишечника, поджелудочной железы и мозга. Дальнейшие исследования БКК и Q10 должны определить уровни FOXM1.

SKMEL-28 клетки

Дальнейшие эксперименты проводились с использованием SKMEL-28 клеток. Уровни мРНК, присутствующей в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10, сравнивались с уровнями необработанных клеток на различных временных точках с использованием методов ПЦР в режиме реального времени (RT-ПЦР). ПЦР-анализ (SABiosciences) представляет из себя серию оптимизированных для ПЦР в режиме реального времени праймерных анализов в 96-луночных планшетов для задействованных в метаболизме или связанных с

болезнью генов, а также соответствующие контроли количества РНК. ПЦР-анализ осуществляет анализ генной экспрессии с помощью чувствительной ПЦР в режиме реального времени и возможность определения мультигенного профиля на микрочипе.

Таблица 11. Список и классификация мРНК уровней, оцененных по ПЦР-анализам Окислительного Стресса и Антиоксидантной Защиты. Наиболее сильные изменения уровней мРНК после шести часов обработки 100 мкМ Q10 на SKMEL-28 клетках показаны путем визуального выделения названия белка (возрастание – полужирный шрифт; снижение – подчеркивание; нет изменений – серый).

Антиоксиданты:

Глютатиона пероксидазы (GPx): GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSTZ1.

Peroxiredoxins (TPx): PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6.

Другие пероксидазы: CAT, [redacted], CYGB, DUOX1, DUOX2, EPX, **GPR156**, LPO, MPO, PIP3-E, PTGST, PTGS2, PXDN, PXDNL, TPO, TTN.

Другие антиоксиданты: ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNDC2, TXNRD1, TXNRD2.

Гены, вовлеченные в метаболизм активных частиц кислорода (ROS):

Супероксид-дисмутазы (SOD): SOD1, [redacted], SOD3.

Другие гены, вовлеченные в супероксидный метаболизм: ALOX12, CCS, CYBA, DUOX1, DUOX2, [redacted], MT3, NCF1, **NCF2, NOS2A**, NOX5, [redacted], PRG3.

Другие гены, вовлеченные в метаболизм ROS: AOX1, BNIP3, EPHX2, MPV17, SFTPD.

Гены, ответственные за окислительный стресс: ANGPTL7, APOE, ATOX1, CAT, CCL5, [redacted], CYGB, DGKK, DHCR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1, EPX, FOXM1, GLRX2, **GPR156**, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSS, KRT1, LPO, MBL2, MPO, MSRA, [redacted], NME5, NUDT1, OXR1, OXSR1, PDLIM1, PIP3-E, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6, PRNP, RNF7, SCARA3, SELS, SEPP1, SGK2, SIRT2, SOD1, [redacted], SRXN1, STK25, TPO, TTN, TXNRD2.

Таблица 12. Данные различной временной обработки 100 мкМ SKMEL-28. Изменения уровней мРНК мониторились RT-ПЦР методами, и были получены данные по анализам окислительного стресса и антиоксидантной защиты

справ. посл.	**Обозначение**	**Описание**	**6 ч Q10**	**16 ч Q10**	**24 ч Q10**	**48 ч Q10**	**72 ч Q10**
NM_000265	NCF1	Нейтрофильный цитоплазматический фактор 1, (хронический гранулематоз, аутосома 1)	0	высокое	3,3829	15,7838	31,5369
NM_012423	RPL13	Рибосомальный белок	-0,9025	3,1857	2,5492	4,9253	7,82

	A	L13a -					
NM_020820	PREX1	Фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфат-зависимый RAC 1	-3,2971	2,867	0,3222	6,3719	7,476
NM_012237	SIRT2	Сиртуин (молчащего MAT-локуса информационной регуляции 2 гомолог) 2 (S. cerevisiae)	-0,9025	4,0829	4,4766	5,7166	6,6257
NM_005125	CCS	Шаперон меди для супероксиддисмутазы	-0,6206	3,0077	3,452	2,9801	6,1539
NM_181652	PRDX5	Пероксиредоксин 5	-2,995	3,0454	3,5381	4,7955	6,0169
NM_016276	SGK2	Сыворотка/глюкокортикоид регулирумая киназа 2	0	0	0	0,5995	5,937
NM_003551	NME5	Белок, экспрессирующийся в неметастазирующих клетках 5 (нуклеозид-дифосфат киназа)	-0,6652	3,1138	3,3694	3,1549	5,782
NM_004417	DUSP1	Двойная специфичная фосфатаза 1	-0,6998	0,5902	2,7713	3,321	5,5375
NM_001752	CAT	Каталаза	-0,8589	2,8424	0,1046	3,8557	5,3988
NM_000041	APOE	Аполипопротеин E	-0,8212	3,2069	-0,954 3	3,7694	5,3315
NM_000101	CYBA	Цитохром b-245, альфа полипептид	-0,3945	4,3475	3,9208	6,2452	5,0762
NM_000433	NCF2	Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 (65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2)	1,2266	3,0077	0,0954	5,476	0
NM_000963	PTGS2	Простагландин-эндопероксид синтаза 2	-0,6912	2,7046	2,6552	4,0553	-3,3022

		(простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)					
NM_183079	PRNP	Прионный белок (p27-30) (болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстмана-Штрауслера-Шейнкера, фатальная семейная бессонница)	-0,2144	3,5236	2,9086	5,0837	-3,9396
NM_004052	BNIP3	BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3	-2,9376	3,3288	4,312	-18,2069	-4,8424
NM_000242	MBL2	Манноза-связывающий лектин (белок C) 2, растворимый (недостаток опсонина)	-0,3622	-1,9072	-3,0142	-1,1854	-6,4544
NM_021953	FOXM1	Forkhead box M1	-0,8135	0,068	-0,9216	3,3655	-10,0953

Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 (NCF2, 65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2) был одним из тех, чьи мРНК индуцировались вначале (наблюдалось на 6 часах). Впоследствии на временной точке 16 часов и дальше, после задержки на первичной фазе, индуцировались очень высокие уровни нейтрофильного цитоплазматического фактора (NCF1) (хронический гранулематоз, аутосома 1).

Нейтрофильный цитоплазматический фактор 2 является цитоплазматической субъединицей мультибелкового комплекса, известного как НАДФН оксидаза, обычно находимая в нейтрофилах. Эта оксидаза вырабатывает множество супероксидов, которые попадают в полость нейтрофильной фагосомы. НАДФН оксидаза (никотинамид аденин динуклеотид фосфатоксидаза) является связанным с мембраной энзимным коплексом. Ее можно обнаружить в плазматической мембране, а также в мембране фагосомы. Она состоит из шести следующих субъединиц:

a Rho гуанозин трифосфотаза (GTPаза), обычно Rac1 или Rac2 (Rac –

обозначение для Rho-связанного C3 субстрата ботулинического токсина)

Пять "phox" единиц. (Phox – обозначение для фагоцитарной оксидазы)

- P91-PHOX (содержит гем)
- p22phox
- p40phox
- p47phox (NCF1)
- p67phox (NCF2)

Замечено, что уровни других НАДФН оксизад не изменились. Ферментом является NOX5, который является новой НАДФН оксидазой, вырабатывающей супероксиды и действующей как H+ канал (2+)-зависимым образом.

Кроме того, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат-зависимый RAC обменный агент 1(PREX1) также положительно регулировался. Этот белок действует как фактор обмена нуклеотида гуанина для RHO семейства маленьких GTP-связывающих белков (RACs). Показано, что он связывает и активирует RAC1 превращая связанный GDP в свободный GTP. Кодируемый белок, который находится в основном в цитоплазме, активируется фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом и бета-гамма субъединицами гетеротримерных G белков.

Вторым основным рано индуцированным белком была синтаза оксида азота 2A (индуцируемая, гепатоциты) (NOS2A). Оксид азота – реактивный свободный радикал, который действует как биологический медиатор в нескольких процессах, включая нейротрансмиссию и антимикробную и антиопухолевую активность. Этот ген кодирует синтазу оксида азота, которая экспрессируется в печени и индуцируется комбинацией липополисахаридов и определенных цитокинов.

Примером отрицательной белковой регуляции является Forkhead box M1 (FOXM1), про которого известно, что этот белок играет ключевую роль в последовательности событий клеточного цикла, где пики эндогенной экспрессии FOXM1 наблюдаются на фазах S и G2/M. Недавние исследования показали, что FOXM1 регулирует экспрессию множества G2/M-специфичных генов, таких как Plk1, циклин B2, Nek2 и CENPF и играет важную роль в поддержании сегрегации хромосом и стабильности генома. FOXM1 ген в настоящее время известен как

протоонкоген человека. Аномальная сверхрегуляция FOXM1 участвует в онкогенезе базальноклеточной карциномы (БКК). FOXM1 сверхрегуляцию позднее обнаружили в большинстве солидных раков человека, включая рак печени, молочной железы, легких, простаты, шейки матки, кишечника, поджелудочной железы и мозга. Дальнейшие исследования БКК и Q10 должны определить уровни FOXM1.

Эксперимент 3: Анализы ПЦР в режиме реального времени, использующие анализ теплового шока.

Анализы теплового шока были проведены для SCC клеток, и данные регулируемых генов представлены ниже в Таблице 13.

Таблица 13. Гены белков теплового шока, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10 в SCC клетках.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция**	**Локализация**	**Возможные функции**
CCT6B	Шаперонин содержащий TCP1, субъединица 6B (zeta 2)	Отрицательно регулируется на 24 часах	Цитоплазма	Укладка белков и сборка белковых комплексов.
ДНКJA1	DnaJ (Hsp40) гомолог, субсемейство A, член 1	Положительно регулируется на 6 часах.	Ядро	Реагирует на повреждение ДНК и изменения в укладке белков.
ДНКJB13	DnaJ (Hsp40) связанный, субсемейство B, член 13	Отрицательно регулируется на 6 часах.	Неизвестна	Укладка белков и апоптозы.
ДНКJB5	DnaJ (Hsp40) гомолог, субсемейство	Отрицательно регулируется на 6 часах.	Неизвестна	Связывает HSP, участвует в укладке белков

	B, член 5			и в сборке белковых комплексов.
ДНКJС12	DnaJ (Hsp40) гомолог, субсемейство С, член 12	Отрицательно регулируется на 6 часах.	Неизвестна	Связывает HSP, участвует в укладке белков и в сборке белковых комплексов.
ДНКJС4	DnaJ (Hsp40) гомолог, субсемейство С, член 4	Отрицательно регулируется на 6 часах.	Цитоплазма	Связывает HSP, участвует в укладке белков и в сборке белковых комплексов.
ДНКJС5В	DnaJ (Hsp40) гомолог, субсемейство С, член 5 бета	Отрицательно регулируется на 6 часах.	Неизвестна	Участвует в укладке белков, реагирует на изменения в укладке белков.
HSPA8	Теплового шока 70 кДа белок 8	Положительно регулируется на 6 часах.	Цитоплазма	Регулирует TNF, связывает BAG1, STUB1, TP53, участвует в апоптозах.
HSPH1	Теплового шока 105 кДа/110 кДа белок 1	Положительно регулируется на 6 часах.	Цитоплазма	Связывается с HSPA8, важен для укладки белков, реагирует на разворачивание белков и стресс.

Эксперимент 4: Анализы ПЦР в режиме реального времени, использующие диабетический анализ

Эксперименты, описанные в этом примере, были проведены для проверки общей гипотезы, что Q10 оказывает влияние на множество генов и меняет метаболический статус клетки. мРНК из SKMEL-28 клеток, обработанных 100 мкМ Q10, была оценена на RT-ПЦР по набору целевых белков, участвующих в диабетическом и связанными с ним путями. Результаты этого эксперимента демонстрируют, что для нескольких белков, участвующих в путях гликолиза и процессинге инсулина, изменились уровни экспрессии их мРНК (представлено в Таблице 14).

Таблица 14. Основные изменения уровней мРНК в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10 в течение 16 часов.

Refseq	Описание	Обозначение	Кратное изменение после 16 часов (100 мкМ Q10)
NM_000162	Глюкокиназа (гексокиназа 4)	GCK	8,5386
NM_178849	Гепатоцитов ядерный фактор 4, альфа	HNF4A	8,421
NM_005249	Forkhead box G1	FOXG1	4,6396
NM_000599	Инсулин-подобный фактор роста связывающий белок 5	IGFBP5	2,2721
NM_001101	Актин, бета	ACTB	-2,0936
NM_002863	Фосфорилаза, гликоген; печень (болезнь Герса, гликогенез VI типа)	PYGL	-2,65
NM_001065	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A	TNFRSF1A	-2,8011
NM_021158	Гомолог Tribbles 3 (Drosophila)	TRIB3	-2,8011
NM_003749	Инсулин рецептора субстрат	IRS2	-2,9404

	2		
NM_004578	RAB4A, член RAS семейство онкогенов	RAB4A	-3,1296
NM_004176	Регулирующий стеролы элемент, связывающий транскрипционный фактор 1	SREBF1	-3,5455
NM_004969	Инсулин-расщепляющий фермент	IDE	-4,4878
NM_005026	Фосфоинозитид-3-киназа, каталитический, дельта полипептид	PIK3CD	-6,8971
NM_000208	Инсулин рецептор	INSR	-8,6099
NM_003376	Фактор роста эндотелия сосудов А	VEGFA	-15,5194
NM_001315	Митоген-активируемая протеинкиназа 14	MAPK14	-74,3366

Результаты этих первичных экспериментов показывают, что уровни мРНК для множества инсулин-связанных белков модулировались в обоих направлениях. Результаты показывают, что Q10 мог бы влиять на лечение и/или оценку диабетической болезни.

Дальнейшие эксперименты проводились для подтверждения результатов, полученных на SK-MEL-28 клетках, обработанных Q10. Многие гены в SK-MEL-28 клетках регулируются уже на 6 часах после обработки после обработки Q10. Однако первичная регуляция становится менее заметной на 16 и 24 часах. Около 48 часов мы обнаружили, что многие гены диабетического набора снова стали сильно регулируемыми. Совпадающие результаты двух или более независимых экспериментов представлены ниже в таблице 15. В SCC клетках также показана регуляция некоторых генов, на 6 и 24 часах после обработки Q10. Эти результаты, полученные на SCC клетках, представлены в таблице 16, а гены, которые регулируются и в SK-MEL-28 клетках, и в SCC клетках, представлены в таблице 17.

Таблица 15. Связанные с диабетом гены в SK-MEL-28 клетках, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция**	**Локализация**	**Возможные функции**
ADRB3	Адренергический, бета-3-, рецептор	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	cAMP сигналинг, G-белка сигналинг
CEACAM1	Молекула клеточной адгезии 1, связанная с карциоэмбриональным антигеном (билиарный гликопротеин)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Внеклеточное пространство	Анти-апоптоз, позитивная регуляция ангиогенеза.
CEBPA	CCAAT/энхансер связывающий белок (C/EBP), альфа	Положительно регулируется на 48 часах	Ядро	Глюкокортикоидного рецептора сигналинг, VDR/RXR активация.
CTLA4	Цитотоксичный Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Т клеток рецептора сигналинг, активирует CASP8.
DUSP4	Двойная специфичная фосфатаза4	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Фосфатаза
ENPP1	Эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Негативная регуляция пути инсулинового рецептора
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, мезенхимный forkhead 1)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Анти-апоптоз, фактор транскрипции
G6PD	Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа	Положительно регулируется на	Цитоплазма	Пентозофосфатный путь,

		48 часах, затем отрицательно регулируется		метаболизм глутатиона.
HMOX1	Гем оксигеназа (дециклическая) 1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Гем оксигеназа дециклическая
ICAM1	Молекула внутриклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Регулируется аторвастатином, влияет на некоторые каспазы.
IL4R	Интерлейкина 4 рецептор	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Положительная регуляция TP73, связывает IRS1 и IRS2
IRS1	Рецептора инсулина субстрат 1	Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется	Плазматическая мембрана	Связывает инсулин рецептор
IRS2	Рецептора инсулина субстрат 2	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	IGF-1 сигналинг
NSF	N-этилмалеимид-сенситивный фактор	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	GABA сигналинг
PIK3CD	Фосфоинозитид-3-киназа, каталитический дельта полипептид	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Киназа
PPARG	Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, гамма	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Транскрипционный фактор
PRKCB1	Протеинкиназа С, бета 1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	PKC семейство

SELL	Селектин L (молекула адгезии лимфоцитов 1)	Отрицательно регулируется на 48 часах	Плазматическая мембрана	Активирует RAS, MAPK
SREBF1	Стерол-регуляторный элемент связывающий фактор транкрипции 1	Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется	Ядро	Транскрипционный фактор
STXBP1	Синтаксин связывающий белок 1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Цитоплазма	Присутствует в богатой миелином фракции.
TGFB1	Трансформирующий фактор роста, бета 1	Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется	Внеклеточное пространство	Про-апоптоз
NKX2-1	NK2 гомеобокс 1	Отрицательно регулируется на 48 часах	Ядро	Транскрипционный активатор
TNF	Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)	Положительно регулируется на 48 часах	Внеклеточное пространство	Про-апоптоз
TNFRSF1A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A	Отрицательно регулируется на 72 часах	Плазматическая мембрана	Про-апоптоз
VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудовA	Положительно регулируется на 58 часах, затем отрицательно регулируется	Цитоплазма	Киназа

Таблица 16. Связанные с диабетом гены SCC клеток, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10.

Обозначение	**Описание**	**Регуляция.**
G6PD	Глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа	Отрицательно регулируется на 6 часах.
ICAM1	Молекула межклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека	Отрицательно регулируется на 6 часах.
INPPL1	Инозитол полифосфат фосфатаза-подобный 1	Отрицательно регулируется на 6 часах.
NOS3	Оксида азота синтаза 3 (эндотелиальные клетки)	Отрицательно регулируется на 6 часах.
PIK3CD	Фосфоинозитид-3-киназа, катализатор, дельта полипептид	Отрицательно регулируется на 6 часах.
PPARA	Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, альфа	Отрицательно регулируется на 6 часах.
PYGL	Фосфорилаза, гликоген; печень (болезнь Герса, гликогенез VI типа)	Отрицательно регулируется на 6 часах.
SREBF1	Стерол-регуляторный элемент связывающий транкрипционный фактор 1	Отрицательно регулируется на 6 часах.
STXBP2	Синтаксин связывающий белок 2	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TNF	Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)	Отрицательно регулируется на 6 часах.
TNFRSF1A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A	Отрицательно регулируется на 6 и

		24 часах.
VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудов А	Отрицательно регулируется на 6 часах.

Таблица 17. Гены, связанные с диабетом, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10 как в SK-MEL-28, так и в SCC клетках.

Обозначение	**Описание.**
G6PD	Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа
ICAM1	Молекула внутриклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека
PIK3CD	Фосфоинозитид-3-киназа, катализатор, дельта полипептид
SREBF1	Стерол-регуляторный элемент связывающий транкрипционный фактор 1
TNF	Фактор некроза опухолей(TNF суперсемейство, член 2)
TNFRSF1A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1А
VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудовА

Уровни мРНК для множества имеющих отношение к инсулину белков модулировались в обоих направлениях. Q10 оказывает воздействие на регуляцию клеточного метаболизма, и таким образом влияет на болезни, связанные с нарушением метаболизма, такие как диабет. Ниже обсуждаются два белка, которые показали значительную модуляцию.

Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14): Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14) является членом семейства MAP-киназ. MAP-киназы действуют как интеграционные точки во множестве биохимических сигналов и участвуют во множестве клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференциация, регуляция транскрипции и развитие. Результаты этого эксперимента показывают, что MAPK14 обнаружила значительную отрицательную регуляцию.

Гепатоцитов ядерный фактор 4, альфа (HNF4A): HNF4 (гепатоцитов ядерный фактор) является ядерным рецепторным белком, экспрессирующимся по

большей части в печени, кишечнике, почках и бета-клетках поджелудочной железы, который очень важен для развития печени. У человека существуют две изоформы NHF4, альфа и гамма, кодируемые двумя различными генами HNF4A и HNF4G, соответственно. (См., напр.,Chartier FL, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC, Laine B (1994). "Клонирование и секвенирование сДНК, с кодированием гепатоцитного ядерного фактора человека 4 демонстрирует наличие двух изоформ в печени человека". *Gene* **147** (2): 269–72.)

HNF4 первоначально считался «рецептором-сиротой». Однако позже обнаружили, что активность HNF4 поддерживается постоянным связыванием со множеством жирных кислот (см., напр., Sladek F (2002). "В отчаянном поиске ...чего-то". *Mol Cell* **10** (2): 219–221 и Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005). "Регуляция транскрипции гепатического гена при помощи жирных кислот". *J Nutr* **135** (11)). Связывающийся с лигандом домен HNF4, как и у других ядерных рецепторов, принимает каноническую форму односпирального сэндвича (см., напр. Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest AD Jr, Johnson R, Spitzer T, Sefler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP (2002). "Гепатоцитный ядерный фактор 4 является фактором транскрипции, который, в основном, связывает жирные кислоты". *Structure* **10** (9): 1225–34 и Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE (2002). "Кристаллическая структура связывающего домена альфа-лиганда HNF4 в комплексе с эндогенным лигандом жирной кислоты". *J Biol Chem* **277** (41): 37973–6) и взаимодействует с ко-активаторными белками. (см., напр. Duda K, Chi YI, Shoelson SE (2004). "Структурная основа для HNF-4альфа активации при помощи связывания лигандом и соактиватором". *J Biol Chem* **279** (22): 23311–6).

Мутации по гену HNF4-α связаны с развитием приступов диабета взрослых в молодом возрасте (MODY). (см., напр. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001). "Молекулярные механизмы и клиническая патофизиология диабета взрослых в молодом возрасте". *N Engl J Med* **345** (13): 971–80.)

Гепатоцитов ядерный фактор 4 (HNF4) является тканеспецифичным транскрипционным фактором, про которого известно, что он регулирует большое число генов в гепатоцитах и клетках поджелудочной железы. Хотя HNF4 высоко экспрессируется в некоторых отделах почек, о его роли в этом органе и об HNF4-регулируемых генах в почечных клетках известно мало. Распространенность и

активность HNF4 часто уменьшаются в клетках почечной карциномы (RCC), что указывает на то, что некоторые опухоли подавляют функцию HNF4 в почечных клетках. Интересно, что показано, что многие гены, регулируемые HNF4, дерегулируются в исследованиях RCC на микрочипах. Эти гены (ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1, FLJ14146, CSPG2, TRIM9 и HEY1) являются хорошими кандидатами на роль генов, активность которых изменяется при снижении HNF4 в RCC.

В структуре лиганд-связывающего домена HNF4альфа (1M7W.pdb; Dhe-Paganon (2002) JBC, 277, 37973); наблюдался маленький липид, который был выделен из *E. coli*. Кристалл содержит две конформации белка, где удлиненная спираль 10 и короткая спираль 12 имеют альтернативные конформации. Интересно, что при изучении липид-связывающего участка нашли, что там существуют два участка. Один выходящий участок захватывает головную группу маленького липида, и было замечено, что несколько карман-образующих регионов колаколизованы с этим выходящим участком. Есть гипотеза, что Q10 специфически связывается с этим транскрипционным фактором. Когда моделируется, как Q10 встраивается в этот связанный с липидами канал, кольцо Q10 входит в карман (фигура 28). Мутация с неизвестными функциями (E276Q) могла бы иметь потенциал для упорядочения остатков, выпрямляющих этот карман, и тем самым оказывать негативное воздействие на предполагаемое связывание Q10.

Кроме того, в согласии с такой моделью связывания Q10, гидрофобный хвост выходил бы за внутреннюю полость и взаимодействовал бы с удлиненным helix 10. Таким образом, это взаимодействие могло бы потенциально менять конформацию helix 10/12 группы. Это могло бы затем менять равновесие активация/инактивация активности транскрипционного фактора.

ПРИМЕР 7: Анализы антителами на микрочипах

Оценка концентрации белка, связанной с наличием Q10, была проведена с использованием метода антител на микрочипах. Микрочип содержал антитела примерно к 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей.

Первоначальный эксперимент для определения изменений уровней концентрации белков в клетках, обработанных Q10, был проведен на микрочипах с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) и SK-MEL-28 клетками, обработанными 6 или 24 часа. Клетки были собраны и экстрагированы для получения растворимого белкового супернатанта. Две порции белков (~1 мг в общем) из каждого образца (1 мг/мл) каждая были помечены флюоресцентной меткой (Cy3 и Cy5, соответственно). Избыточная метка была удалена из белка, и материал использовался для инкубации на микрочипах. Для сравнения образцов с двух временных точек были смешаны равные количества белка, при этом каждый образец относился к различному меченому типу (напр., 3-часовой экстракт, меченый Cy3, был смешан с 24-часовым экстрактом, меченым Cy5). После инкубации с микрочипом (в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем), микрочипы были промыты и высушены. Микрочипы сканировались на флюоресцентном лазерном сканере для подсчета сравнительной флюресцентной интенсивности Cy3 и Cy5 меток.

Таблица 18. Белки с повысившимися уровнями в SK-MEL-28 клетках после 24-часовой обработки 50 мкМ Q10

Название	**Соотношение**
Cdk1	0,1
DcR1	0,1
Протеинкиназа Cb2	0,1
Фактора некроза опухолей растворимый рецептор II	0,1
BAD	0,1
Каспаза 13	0,2
FBI1 PAKEMON	0,2
Zyxin	0,2
Cdc25A	0,3

Название	**Соотношение**
Белок теплового шока 110	0,4
Серин треонин протеинфосфатаза 1g1	0,4
COX II	0,5
HSP70	0,5
BLK	0,5
Цитокератин 8 12	0,5
BUBR1	0,5
FOXC2	0,5
Серин треонин протеинфосфатаза 2 A Bg	0,5

PIASx	0,3
Фактор роста нервов b	0,3
Протеинтирозинфосфатаза PEST	0,3
hBRM hSNF2a	0,4
GRP94	0,4
Кальмодулин	0,4
Серин треонин протеинфосфатаза 2C a b	0,4
ARC	0,4
НеурабинII	0,4
Синтаза оксида азота bNOS	0,4
Серин треонин протеинфосфатаза 1b	0,4

MSH6	0,5
DR6	0,5
Rad17	0,5
BAF57	0,5
Трансформирующий фактор роста b pan	0,5
BTK	0,5
Серин треонин протеинфосфатаза 2 A/B pan2	0,5
CNPаза	0,5
SynCAM	0,5
Ядерный антиген пролиферирующих клеток	0,5

Таблица 19. Белки с возросшими уровнями в SK-MEL-28 клетках после 24-часовой обработки 50 мкМ Q10

Название	**Соотношение**
BclxL	4,2
BID	3,7
Bmf	3,7
PUMA bbc3	3,0
Zip-Киназа	2,8
Bmf	2,8
DcR2	2,7
E2F1	2,7
FAK pTyr577	2,5
FKHRL1 FOXO3a	2,5

Название	**Соотношени**
Класпин	2,1
GRP75	2,1
Каспаза 6	2,1
ILP2	2,1
aАктинин	2,1
Витронектин	2,1
DRAK1	2,1
PTEN	2,1
Grb2	2,1
HDAC4	2,0

MTBP	2,5
Коннексин 32	2,5
Аннексин VII	2,4
p63	2,4
SUMO1	2,4
IAfadin	2,3
MDMX	2,3
Pyk2	2,3
RIP Рецептор-взаимодействующий белок	2,3
RICK	2,3
IKKa	2,3
Bclx	2,3
Afadin	2,2
Пролиферирующий клеточный белок Ki67	2,2
Гистон H3 pSer28	2,2
CASK LIN2	2,2
Центрин	2,2
TOM22	2,1
Синтаза оксида азота эндотелиальная eNOS	2,1
Протеинкиназа Ba	2,1
Ламинин	2,1
Миозина Ib ядерный	2,1
Каспаза 7	2,1

HDAC7	2,0
Синтаза оксида азота bNOS	2,0
HDAC2	2,0
p38 MAPK	2,0
Рилин	2,0
Протеинкиназа Cd	2,0
cerbB3	2,0
hSNF5 INI1	2,0
Протеинкиназа Ca	2,0
Глутаматный рецепторNMDAR 2a	2,0
Лептин	2,0
Диметилированный гистон H3 diMeLys4	2,0
BID	2,0
MeCP2	2,0
Рецептор фактора роста нервов p75	2,0
Киназа легких цепей миозина	2,0
cRaf pSer621	2,0
GRP78 BiP	2,0
cMyc	2,0
Raf1	2,0
MTA2 MTA1L	2,0
Sir2	2,0
ATF2 pThr69 71	2,0

MAP Киназа 2 ERK2	2,1	Протеинкиназа C	2,0
KIF17	2,1	Протеинкиназа Cb2	2,0

Для того чтобы подтвердить ранее наблюдавшиеся апоптозные белки, и чтобы расширить оценку по большому числу про-апоптозных и анти-апоптозных белков, были выбраны два метода исследования, по которым можно скринировать большое семейство потенциально задействованных белков.

Во-первых, микрочип с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скрининга с использованием 700 белковых антител для определения изменений в уровнях концентраций белков в SK-MEL-28 клетках, обработанных 24 часа с 50 мкМ Q10.

Из экспериментов с антителами, на SKMEL-28 с Q10 (24 ч), были идентифицированы следующие белки с измененными уровнями: Bcl-xl, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Коннексин 32, PUMA bbc3, BID, Par4, cCbl. Главное заключение, выведенное из этого первичного исследования, состояло в том, что на ожидаемые пре-апоптозные белки было оказано влияние.

Исследования на микрочипах с антителами на SK-MEL-28

Микрочип с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скрининга с использованием 700 белковых антител для определения изменений в уровнях концентраций белков в SK-MEL-28 клетках, обработанных 24 часа с 50 мкМ Q10.

Таблица 20. Изменения уровней белка в SKMEL-28, обработанных 50 мкМ Q10

Название	**Номер антител (Sigma)**	**SKMEL28 Q10/ SKMEL28 контроль**	**SKMEL28/ HEKa контроль**	**HEKa Q10/ HEKa контроль**
BclxL	B9429	2,46	1,04	1,83
PUMA bbc3	P4743	2,31	1,14	2,14
Bmf	B1559	2,23	1,12	2,11
Bmf	B1684	2,09	1,13	1,74
cJun pSer63	J2128	1,99	1,14	1,85

BLK	B8928	1,94	1,05	1,51

Из экспериментов с антителами, на SKMEL-28 с Q10 (24 ч), были идентифицированы следующие белки с измененными уровнями: Bcl-xl, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Коннексин 32, PUMA bbc3, BID, Par4, cCbl. Эти данные подтверждают, что уровни пре-апоптозных белков изменились после инкубации с повышенными уровнями экзогенно добавленного Q10.

Bcl-xl ("базальноклеточная лимфома сверхбольшая") является трансмембранной молекулой в митохондриях. Она включена в сигнальный путь трансдукции FAS-L и является одним из нескольких антиапоптозных белков, которые являются членами белкового семейства Bcl-2. Она задействована в выживании раковых клеток. Однако известно, что альтернативный сплайсинг Bcl-x мРНК человка может приводить к по крайней мере двум различным видам Bcl-x мРНК, Bcl-xL и Bcl-xS. Преобладающий белковый продукт (233 аминокислоты) – более крупная Bcl-x мРНК, Bcl-xL, которая подавляет клеточную гибель вследствие удаления фактора роста (Boise et al., 1993 . Cell 74, 597-608). Bcl-xS, а с другой стороны, ингибирует возможность Bcl-2 ингибировать клеточную гибель и делает клетки более восприимчивыми к апоптозной гибели клеток.

Таблица 21. Протеины с возросшими уровнями в SCC клетках после 24 часов обработки 100 мкМ Q10.

Название	**Соотношение**
PUMA bbc3	3,81
HDAC7	3,21
BID	3,12
MTBP	3,00
p38 MAP Киназа неактивированная	2,93
PKR	2,87
TRAIL	2,86
DR5	2,86
Cdk3	2,82
NKадгерин	2,71

Название	**Соотношение**
Sir2	2,25
DcR3	2,24
RbAp48 RbAp46	2,21
OGlcNAc Трансфераза	2,21
GRP78 BiP	2,20
Sin3A	2,20
p63	2,20
Пресенилин1	2,19
PMЛ	2,18
PAK1pThr212	2,17

Рилин	2,68
p35 Cdk5 Регулятор	2,63
HDAC10	2,60
RAP1	2,59
PSF	2,56
cMyc	2,55
Метилированного гистона H3 MeLys9	2,54
HDAC1	2,51
F1A	2,48
ROCK1	2,45
Bim	2,45
FXR2	2,44
DEDAF	2,44
DcR1	2,40
APRIL	2,40
PRMT1	2,36
Pyk2 pTyr580	2,34
Витронектин	2,33
Синаптоподин	2,32
Каспаза13	2,30
Синтаксин 8	2,29
DR6	2,29
BLK	2,28
ROCK2	2,28

HDAC8	2,16
HDAC6	2,15
Синтаза оксида азота индуцируемая iNOS	2,15
Нейрофибромин	2,15
Синтаксин 6	2,13
Parkin	2,12
Rad17	2,11
Синтаза оксида азота bNOS	2,10
TIS7	2,09
OP18 Статмин (статмин 1/онкобелок 18)	2,08
фосфо-b-Катенин pSer45	2,07
НеурабинII	2,07
e Тубулин	2,07
PKB pThr308	2,07
Орнитин Декарбоксилаза	2,07
P53 BP1	2,06
Pyk2	2,05
HDAC5	2,05
Коннексин 43	2,05
a1Синтрофин	2,04
MRP1	2,04
cerbB4	2,03
S Нитроцистеин	2,03
SGK	2,02
Rab5	2,01
Убиквитина С терминальная гидролаза L1	2,01

Миозина Ib ядерный	2,00
Par4 апоптозного ответа простаты 4	2,00

Таблица 22. Протеины с понизившимися уровнями в SCC клетках после 24 часов обработки 100 мкМ Q10.

Название	Соотношение
AP1	0,68
Центрин	0,55
CUGBP1	0,67
Цистатин A	0,69
Цитокератин CK5	0,60
Фибронектин	0,63
gParvin	0,70
Независимый фактор роста 1	0,63
Фактор роста нервов b	0,60
ПроКаспаза 8	0,72
Rab7	0,62
Rab9	0,73
Серин треонин протеинфосфатаза 1g1	0,71
Серин треонин протеинфосфатаза 2 A Bg	0,73
SKM1	0,70
SLIPR MAGI3	0,67
Спектрин a и b	0,70
Spred2	0,66
TRF1	0,74

ПРИМЕР 8: Иммуноблоттинги

Первый эксперимент, проведенный и оцененный с помощью иммуноблоттинга и 2-D гель-электрофорезов был осуществлен на линии клеток

рака кожи SKMEL-28. В этой экспериментальной серии участвовали SK-MEL-28 клетки, обработанные в течение 3, 6, 12, и 24 часов 50 или 100 мкМ Q10.

Различные типы клеток были оценены путем иммуноблоттинга с антителами к Bcl-xL (фигура 14), антителами к Виментину (фигура 15), серией антител к функции митохондриального окислительного фосфорилирования (фигуры 16-21) и с серией антител, связанных с целостностью митохондриальной мембраны (фигуры 22-27). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что некоторые из исследуемых белков в результате обработки клеток Q10 показали положительную или отрицательную регуляцию.

ПРИМЕР 9: Связанные с диабетом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 um Q10

Диабетные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 23 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: ABCC8, ACLY, ADRB3, CCL5, CEACAM1, CEBRA, FOXG1, FOXP3, G6PD, GLP1R, GPD1, HNF4A, ICAM1, IGFBP5, INPPL1, IRS2, MAPK14, ME1, NFKB1, PARP1, PIK3C2B, PIK3CD, PPARGC1B, PRKAG2, PTPN1, PYGL, SLC2A4, SNAP25, HNF1B, TNRFSF1A, TRIB3, VAPA, VEGFA, IL4R и IL6.

Table 23: Гены диабетного анализа, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке положительно регулируются (серый) и отрицательно регулируются (белый)

Название гена	Функция гена
ADRB	cAMP сигналинг, G-белка сигналинг
CCL5	Природные лиганды для CCR5 и регулируется TNF.
CEACAM1	Анти-апоптозная, позитивная регуляция ангиогенеза
GLPR1	Повышение инсулиновой и уменьшение секреции

	глюкагоновой секреции поджелудочной железой
GPD1	Метаболизм углеводов, НАДН окисление.
ICAM1	Регулируется аторвастатином, процессирует некоторые каспазы.
MAPK14	Контрольная точка повреждения ДНК, ангиогенез, процесс метаболизма глюкозы.
PARP1	ДНК восстановление, регулирует TP53, NOS2A, NFKB, восстановление теломеров
PIK3C2B	Фосфоинозитид опосредованный сигналинг, регулирует AKT и AKT1.
PIK3CD	Киназа
PYGL	Метаболизм углеводов, регулирует гликоген и гликогенсинтазу
SLC2A4	Регулирует глюкозу и регулируется INS и инсулином.
SNAP25	Регуляция инсулиновой секреции, захват нейротрансмиттера.
CEBPA	Глюкокортикоидных рецепторов сигналинг, VDR/RXR активация.
FOXP3	Регулирует IL4, IL2.
G6PD	Пентозофосфатный путь, метаболизм глутатиона.
IGFBP5	Регуляция клеточного роста, регулируется IGF1
INPPL1	Регулирует Akt и гликоген.
IRS2	IGF-1 сигналинг
ME1	Регулирует яблочную кислоту и регулируется T3.
NFKB1	Регулирует IL6 и TNF.
PPARGC1B	Регулируется MAPK14
PRKAG2	Биосинтез жирных кислот, холестерина.
PTPN1	Дефосфорилирует JAK2 и EGFрецептор киназы.
VEGFA	Киназа, ангиогенез
IL4R	Положительно регулируется TP73, связывается с IRS1 и IRS2
HNF1B	HNF4A
TNFRSF1A	Про-апоптоз
TRIB3	Регулирует AKT1 и негативный регулятор NFkB.

VAPA	Регулирует NFkB, миграцию везикул.

ПРИМЕР 10: Связанные с ангиогенезом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 мкМ Q10

Ангиогенезные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 24 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: AKT1, ANGPTL4, ANGPEP, CCL2, CDH4, CXCL1, EDG1, EFNA3, EFNB2, EGF, FGF1, ID3, IL1B, IL8, KDR, NRP1, PECAM1, PROK2, SERPINF1, SPHK1, STAB1, TGFB1, VEGFA и VEGFB.

Таблица 24: Список генов, связанных с ангиогенезом, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке положительно регулируются (серый) и отрицательно регулируются (белый)

Ген	Функция гена.
ANGPTL4	антиангиогенез, негативный регулятор апоптозов, метаболизм липидов.
CDH5	Развитие кровяных сосудов, клеточная адгезия, негативный регулятор клеточной пролиферации.
FGF1	клеточная адгезия, клеточная пролиферация.
AKT1	Процесс метаболизма углеводов, процесс биосинтеза гликогена, процесс метаболизма глюкозы, путь сигналинга рецептора инсулина, активация про-апоптозных генных продуктов, апоптозные изменения митохондрий
ANPEP	протеолизиз, развитие многоклеточности, клеточная дифференциация
CCL2	хемотаксис, анти-апоптоз, JAK-STAT каскад, морфогенез органов, репликация вирусного генома

CXCL1	хемотаксис, воспалительная реакция, иммунный ответ, негативная регуляция клеточной пролиферации, организация и биогенез актинового цитоскелета
EDG1	позитивная регуляция клеточной пролиферации, трансмиссия нервного импульса, регуляция клеточной адгезии, дифференцировка нейронов, позитивная регуляция миграции клеток, позитивная регуляция Ras
EFNB2	клетка-клетка сигналинг, регулируется VEGFA.
EGF	Активация активности MAPKK, позитивная регуляция митозов, ДНК репликация
ILIB	Ответ на глюкокортикоидную стимуляцию, апоптозы, сигнальная трансдукция, клетка-клетка сигналинг, негативная регуляция клеточной пролиферации
IL8	Задержка клеточного цикла
KDR	VEGF путь, регулируется AKT.
NRP1	клеточная адгезия, сигнальная трансдукция, клетка-клетка сигналинг, клеточная пролиферация, регулируется VEGFA
PECAM1	Клеточная адгезия, регулируемая TNF.
PROK2	Активация MAPK, анти-апоптоз, клеточная пролиферация, регулирует AKT,
SPHK1	анти-апоптоз, клеточная пролиферация, регулирует митозы, миграцию клеток.
STAB1	Воспалительная реакция, клеточная адгезия, рецептор-опосредованный эндоцитоз, клетка-клетка сигналинг, негативная регуляция ангиогенеза, защитная реакция на бактерии
VEGFA	анти-апоптоз, регулирует TNF, регулируется HIF1.

ПРИМЕР 11: Связанные с апоптозом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 мкМ Q10

Апоптозные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены

практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 25 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: ABL1, AKT1, Bcl2L1, BclAF1, CASP1, CASP2, CASP6, CIDEA, FADD, LTA, TNF, TNFSF10A и TNFSF10.

Таблица 25: Список генов, связанных с апоптозами, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке положительно регулируются (серый) и отрицательно регулируются (белый)

Ген	Функция гена
CASP1	Про-апоптоз, Регулирует IL1B, регулируется TNF.
CASP6	Про-апоптоз, регулирует PARP, MCL1, APP
TNF	Клеточная пролиферация, дифференцировка, апоптозы, метаболизм липидов и коагуляция
TNFSF10	Про-апоптоз, регулирует каспазы
ABL1	Регулирует Bcl2L1, TP53, про-апоптоз, организация и биогенез актинового цитоскелета.
AKT1	Про-апоптоз, апоптозные изменения в митохондриях, транспорт углеводов, реакция на тепловой шок, метаболизм глюкозы, путь IGF сигналинга.
BclAF1	Про-апоптоз.
Bcl2L1	Анти-апоптоз, высвобождение цитохрома с из митохондрий, регулирует каспазы, связывается с BAD, BAX, BCl2L11
CASP2	Анти-апоптоз.
CIDEA	Про-апоптоз
FADD	Про-апоптоз
LTA	Про-апоптоз
TNFSF10A	Активатор каспаз

ПРИМЕР 12: ПЦР диабетический анализ на клетках рака печени (HepG2)

HepG2 (рака печени) клетки были обработаны или раствором-носителем в течение 24 часов, или 100 мкМ Q10 в течение различного времени. Обработка

была проведена на $1x10^5$ клеток на лунку, после чего следовала процедура, использованная для PaCa2 клеток (выше, примеры 9-11). Однако общее количество РНК, выделенной из этих образцов, было ниже ожидаемого. Обратная транскриптаза нормально работает при использовании 1 мкг общей РНК (определено подсчетом на 260 нм). Максимальный объем, который мог быть использован для обратной транкриптазы, составляет 8 мкл. Поскольку концентрация РНК была низкой, в RT-ПЦР анализах использовались образцы, обработанные раствором-носителем и Q10 в течение 16 часов и 48 часов с использованием 0,44 мкг РНК. Был проведен первичный анализ тенденций и паттернов в регуляции генов HepG2 обработкой 100 мкМ Q10, как представлено в таблице 26 ниже. Результаты показали, что каждый из генов PPARGC1A, PRKAA1 и SNAP25 показал отрицательную регуляцию на 16 часах после обработки (примерно в 20 раз, 6 раз и 5 раз, соответственно). На 48 часах после обработки PPARGC1A и PRKAA1 показали нормальное состояние или слабую положительную регуляцию, тогда как SNAP25 показал отрицательную регуляцию примерно в 2 раза.

Таблица 26: Список генов, регулируемых в диабетическом анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

Ген	**Название гена**	**Функция гена.**
PPARGC1A	Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом гамма, коактиватор 1 альфа	Участвует в гибели клеток, пролиферации, клеточном дыхании и трансмембранном потенциале.
PRKAA1	протеинкиназа, AMP-активируемый, альфа 1 каталитическая субъединица	Регулирует TP53 и участвует в апоптозах, регулирует гликолиз, регулирует активность метаболитических ферментов.
SNAP25	Синаптосомально-ассоциированный белок, 25кДа	Играет роль в транспорте, встраивании, экзоцитозе и высвобождении молекул.

ПРИМЕР 13: ПЦР ангиогенезный анализ на клетках рака печени (HepG2)

HepG2 (рака печени) клетки были обработаны или раствором-носителем в течение 24 часов, или 100 мкМ Q10 в течение различного времени. Обработка была проведена на $1x10^5$ клеток на лунку, после чего следовала процедура, использованная для PaCa2 клеток (выше, примеры 9-11). Однако общее количество РНК, выделенной из этих образцов, было ниже ожидаемого. Обратная транскриптаза нормально работает при использовании 1 мкг общей РНК (определено подсчетом на 260 нм). Максимальный объем, который мог быть использован для обратной транкриптазы, составляет 8 мкл. Поскольку концентрация РНК была низкой, в RT-ПЦР анализах использовались образцы, обработанные раствором-носителем и Q10 в течение 16 часов и 48 часов с использованием 0,44 мкг РНК. Был проведен первичный анализ тенденций и паттернов в регуляции генов HepG2 обработкой 100 мкМ Q10, как представлено в таблице 27 ниже. Результаты показали, что каждый из генов ANGPTL3, ANGPTL4, CXCL1, CXCL3, CXCL5, ENG, MMP2 и TIMP3 показал положительную регуляцию на 16 часах после обработки (примерно в 5.5, 3, 3, 3.2, 3, 3, 1 и 6.5 раз, 6 раз и 5 раз соответственно). ID3 показал отрицательную регуляцию на 16 часах после обработки Q10, примерно в 5 раз по сравнению с контролем. На 48 часах после обработки ANGPTL3, CXCL1, CXCL3, ENG и TIMP3 еще показывали положительную регуляцию (примерно в 3.5, 1.5, 3.175, 2 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем), тогда как ANGPTL4, CXCL5, ID3 и MMP2 показывали отрицательную регуляцию примерно в 1, 1, 2 и 18 раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 27: Список генов, регулируемых в ангиогенезном анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

Ген	**Название гена**	**Функция гена**
ANGPTL3	ангиопоэтин-подобный 3	Преимущественно экспрессируется в печени, роль в клеточной миграции и адгезии, регулирует метаболизм жирных кислот и глицерина.
ANGPTL4	ангиопоэтин-подобный 4	Регулируется PPARG, ингибитор апоптозов в эндотелиоцитах сосудистой

		стенки, играет роль в метаболизме липидов и глюкозы и чувствительности к инсулину
CXCL1	хемокин (C-X-C motif) лиганд 1 (меланомы роста стимуляция активности, альфа)	Роль в клеточной пролиферации и миграции
CXCL3	хемокин (C-X-C motif) лиганд 3	Активация хемокинов, активация звездчатых клеток печени, миграция, пролиферация.
CXCL5	хемокин (C-X-C motif) лиганд 5	Продукция вместе с IL8 при стимуляции IL1 или TNFA. Играет роль в хемотаксисе, миграции, пролиферации.
ENG	Эндоглин	Связывание с TGFBR и участие в миграции, пролиферации, прикреплении и инвазивности
ID3	Ингибитор ДНК связывающегося 3, доминантного негативного helix-loop-helix белка	Регулирует MMP2, регулируется TGFB1, витамином D3, ретиноевой кислотой, VEGFA, участвует в апоптозах, пролиферации, дифференцировке, миграции.
MMP2	матрикса металлопептидаза 2 (желатиназа А, 72кДа желатиназа, 72кДа тип IV коллагеназа)	Активация звездчатых клеток печени, HIF□ сигналинг, связывание с TIMP3, участие в образовании опухолей, апоптозах, пролиферации, инвазионности, миграции и хемотаксисе.
TIMP3	TIMP металлопептидаз ингибитор 3	Регулирует MMP2, ICAM1. Регулируется TGFB, EGF, TNF, FGF и TP53. Участвует в апоптозах, клеточной адгезии и злокачественном перерождении.

Белки, известные своим участием в процессе ангиогенеза, были компонентами RT-ПЦР анализа. Ангиогенез является критически важным процессом, благодаря которому раковые клетки становятся злокачественными. Некоторые из этих белков также вовлечены в диабет.

ANGPTL3 и ANGPTL4: В литературе, имеющей отношение к ANGPTL3, этот белок связывается с регуляцией метаболизма липидов. В частности, из литературы (Li, C. *Curr Opin Lipidol.* 2006 Apr;17(2):152-6) известно, что и ангиопоэтины, и ангиопоэтин подобные белки имеют сходные структуры доменов. ANGPTL3 и 4 единственные два члена этого суперсемейства, которые ингибируют активность липопротеинлипаз. Однако ANGPTL3 и 4 по-разному регулируются на многих уровнях, что подтверждается тем, что in vivo их функции не избыточны. ANGPTL3 и 4 протеолетически превращаются в две половины и по-разному регулируются ядерными рецепторами. Трансгенная сверхэкспрессия ANGPTL4, так же как нокаут ANGPTL3 или 4 демонстрируют, что эти два белка играют важную роль в метаболизме липопротеинов: образующийся в печени ANGPTL3 ингибирует липопротенилипазную активность преимущественно во время пищеварения, тогда как ANGPTL4 играет важную роль и во время пищеварения, и в промежутках между пищеварением. Кроме того, ANGPTL4 регулирует тканеспецифичную доставку липопротеин-производных жирных кислот. ANGPTL4 таким образом является эндокринным или аутокринным/паракринным ингибитором липопротеинлипаз, в зависимости от места экспрессии.

Липопротеинлипаза является ферментом, который гидролизует липиды в липопротеинах, таких как хиломикроны и липопротеины с очень низкой плотностью (VLDL), в три жирные кислоты и одну молекулу глицерина. Липопротеинлипазная активность в данных тканях является лимитирующей скорость стадией для усваивания триглицерид-производной жирной кислоты. Дисбаланс в разделении жирных кислот имеет значительные метаболические последствия. Показано, что высокожировые диеты приводят к тканеспецифичной сверхэкспрессии LPL, которая задействована в тканеспецифичной резистентности к инсулину и последующем развитии сахарного диабета типа 2.

Результаты этого примера показывают, что Q10 модулирует белки, участвующие в метаболизме липидов, что подтверждает важность дальнейших исследований ANGPTL3/ANGPTL4 и связанных с ними обменных путей. Например, ANGPTL3/ANGPTL4 играют определенную роль в следующих путях: Akt, холестерин, жирные кислоты, HDL-холестерин, HNF1A, ITGA5, ITGA5, ITGAV, ITG83, L-трилодотинонин, LIPG, LPL, Mapk, Nrth, NR1H3, PPARD, PTK2,

RXRA, триацилглерол и 9-цис-ретиноевая кислота.

ПРИМЕР 14: ПЦР анализ на клетках рака печени (HEPG2)

Апоптозные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10 в течение 16 и 48 часов, как описано выше. Однако анализ для 48 часов был проведен с использованием в качестве фулорофора FAM, а не SYBR. И FAM, и SYBR флуоресцируют на одной длине волны.

Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 28 ниже. Результаты показывают, что CASP9 показала положительную регуляцию на 16 часах после обработки Q10, примерно в 61 раз по сравнению с контролем, тогда как BAG1 и TNFRSF1A показали отрицательную регуляцию на 16 часах после обработки примерно в 6 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контролем. На 48 часах после обработки CASP9, BAG1 и TNFRSF1A показали положительную регуляцию примерно в 55, 1 1 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 28: Список генов, регулируемых в апоптозном анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

Ген	**Название гена**	**Функция гена.**
BAG1	BCL2-ассоциированый атаноген	Участвует в апоптозах
CASP9	каспаза 9, связанная с апоптозом цистеинпептидаза	Апоптоз через высвобождение цитохрома с.
TNFRSF1A	Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A	Анти-апоптоз, связывает многие факторы гибели клеток, регулирует ICAM1

ПРИМЕР 15: Определение способности МВМ или эпи-переключателя лечить онкологическое расстройство

Способность выбранного МВМ или эпи-переключателя, *напр.*, CoQ10, воздействовать на онкологическое расстройство, *напр.*, меланому, оценивалось на

мышиной модели. Меланомные опухоли вызываются у мышей инъекцией SK-MEL28 в подкожный слой. В исследование на животных входили как контрольная, так и лечебная группы, каждая состояла из четырех мышей. Мышам привили две опухоли. Местная формула MBM или эпи-переключателя применялась к опухолям в лечебной группе ежедневно в течение 30 дней, после чего опухоли вырезали и определяли их массу. MBM или эпи-переключатель идентифицировался как эффективный в лечении опухоли, если разница средней массы лечебной группы и контроля была достоверной.

Пример 16: Идентификация MBM, связанной с онкологическим расстойством.

Для того чтобы оценить перспективную молекулу (напр., фактор влияния) как потенциальную MBM, выбранная перспективная MBM экзогенно добавлялась к нескольким клеточным линиям, включая как больные (раковые) линии клеток, так и линии нормальных контрольных клеток, и оценивались изменения, вызванные в профиле клеточного микроокружения для каждой клеточной линии. Изменения в клеточной морфологии, физиологии и/или составе клеток, включая, например, мРНК и уровни белков, оценивались и сравнивались для больных клеток по сравнению с нормальными клетками.

Изменения в клеточной морфологии/физиологии оценивались по определению чувствительности и апоптозного ответа клеток к перспективной MBM. Эти эксперименты проводились, как детально описано в примере 3. Вкратце, группа клеточных линий, содержавшая по крайней мере одну контрольную линию клеток и по крайней мере одну линию раковых клеток подвергалась воздействию различных концентраций перспективной MBM. Чувствительность клеточных линий к потенциальной MBM оценивалась по мониторингу клеточного выживания в разное время и в диапазоне применявшихся концентраций. Апоптозный ответ клеточных линий к потенциальной MBM оценивался с использованием, например, Nexin реагента в комбинации с методом проточной цитометрии. Nexin реагент содержит комбинацию двух красителей, 7AAD и Annexin-V-PE, и позволяет оценить популяцию клеток на раннем и позднем апоптозах. Можно использовать дополнительный апоптозный анализ,

который оценивает однонитевые ДНК, с использованием, например, APOSTRAND™ ELISA метода. Чувствительность и апоптозный ответ больных и контрольных клеточных линий оценивались и сравнивались. Молекула, которая демонстрирует различную цитотоксичность и/или по-разному вызывает апоптозный ответ в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицировалась как MBM.

Оценивались изменения в составе клеток после воздействия перспективной MBM. Изменения в экспрессии генов на уровне мРНК анализировались с использованием метода ПЦР-анализа в режиме реального времени. Эти эксперименты проведены, как описано детально в примерах 6 и 9-13. Вкратце, перспективная MBM экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и мРНК выделялась из клеток через различное время после воздействия. Уровень мРНКs для генов, участвующих в специфичных путях, оценивался с использованием целевых анализов, включая, например, анализы, специфичные для апоптозов, окислительного стресса и антиоксидантной защиты, ангиогенеза, теплового шока или диабета. Гены, у которых транскрипция их мРНК менялась в два раза или больше, идентифицировались и оценивались. Молекула, которая вызывает изменения в уровнях мРНК в клетках и/или вызывает различные изменения в уровне одной или более мРНК в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицировалась как MBM.

В дополнительных экспериментах, изменения в экспрессии генов по уровню белка анализировались с использованием метода антител на микрочипах, 2-мерного гель электрофореза, за которым следовала идентификация белка с использованием масс-спектрометрии, и иммуноблоттинга. Эти эксперименты проведены, как описано в примерах 7, 4 и 8, соответственно. Вкратце, перспективная MBM экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и растворенный белок экстрагировался из клеток в различное время, напр., на 6 часах или 24 часах после обработки. Изменения, вызванные в уровнях белков перспетивной MBM, оценивались с использованием микрочипов с антителами, содержащих антитела к около 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей. Дальнейший

дополнительный протеомический анализ мог быть проведен с использованием мерного (2-D) гель-электрофореза в совокупности с методом масс-спектрометрии. Перспективная МВМ экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и клеточный осадок лизировался и подвергался 2-D гель-электрофорезу. Гели анализировались для идентификации изменений в уровнях белков в обработанных образцах по сравнению с контрольными, необработанными образцами. Гели анализировались для идентификации изменений на временных точках, для того чтобы определить возросшие уровни, снизившиеся уровни или посттрансляционную модификацию. Точки, показавшие статистически достоверные изменения, извлекались и подвергались белковой идентификации расщеплением пепсином и характеризации масс-спектрометрией. Проводился поиск охарактеризованных пептидов в белковой базе данных, например, с программными анализами Mascot и MSRAT для идентификации белков. В дополнение к вышеупомянутым 2-D гель анализам и экспериментам с антителами на микрочипах, потенциальные изменения в уровнях специфических белков, вызванные перспективной МВМ, могли быть оценены путем иммуноблоттинга. Во всех протеомических экспериментах белки с возросшими или снизившимися уровнями в различных клеточных линиях идентифицировались и оценивались. Молекула, которая вызывает изменения в уровнях белков в клетках и/или вызывает различные изменения в уровне одного или более белков в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицируется как МВМ.

Гены, относительно которых было обнаружено, что они модулируются воздействием перспективной МВМ из вышеупомянутых экспериментов, становились объектами клеточных и биохимических путей анализов и в соответствии с ними могли быть разделены на несколько клеточных путей метаболизма, включая апоптозы, биологию рака и рост клеток, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Проводились эксперименты для подтверждения вхождения перспективной МВМ в клетки, для определения того, локализовалась ли перспективная МВМ внутри клетки, и для определения уровня и формы перспективной МВМ, присутствующей в клетке. Эксперименты проводились, например, как описано

детально в примере 5. Например, для определения уровня и формы перспективной МВМ, присутствующей в митохондриях, получались и анализировались богатые митохондриями препараты из клеток, обработанных перспективной МВМ. Тем самым можно подтвердить, что уровень перспективной МВМ, присутствующей в митохондриях, возрастает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенной перспективной МВМ. Кроме того, изменения уровней белков из богатых митохонриями образцов анализировались с использованием 2-D гель-электрофореза, и белок идентифицировался с помощью масс-спектроскопии, как описывалось выше для белковых образцов из целых клеток. Перспективные МВМ, для которых обнаружено, что они проникают в клетку и присутствуют в повышенной концентрации, *напр.*, в митохондриях, идентифицировались как МВМ. Уровни перспективной МВМ в клетках, или, например, специфически в митохондриях, определявшиеся на разных временных точках, могут коррелировать с другими наблюдаемыми клеточными изменениями, что подтверждается, например, модуляцией мРНК и уровней белка для определенных белков.

Перспективные МВМ, для которых было установлено, что они вызывают изменения в составе клеток, *напр.*, вызывают изменения экспрессии генов на уровне мРНК или белков, идентифицируются как МВМ. Перспективные МВМ для которых было установлено, что они вызывают разные изменения в морфологии, физиологии или составе клеток (*напр.*, разные изменения экспрессии генов на уровне мРНК или белков), в болезненном состоянии (*напр.*, раковых) по сравнению с нормальными (*напр.*, нераковыми) клетками идентифицируются как МВМ и, в особенности, как имеющие многоаспектный характер. Перспективные МВМ, относительно которых было обнаружено, что они способны проникать в клетки, идентифицировались как МВМ и, в особенности, как имеющие многоаспектный характер, поскольку тем самым перспективные МВМ демонстрировали в добавление к терапевтическому действию также и действие молекулы-переносчика.

Пример 17: Идентификация CoQ10 как эпи-переключателя, связанного с онкологическим расстройством

Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неместастазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; илиr SCC, плоскоклеточная карцинома; PaCa2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций коэнзима Q10. Линии раковых клеток показали дозозависимый ответ, отличавшийся по сравнению с контрольными линиями клеток, где индукция апоптозов и клеточная гибель имели место только в раковых клетках. Примеры экспериментов описаны детально, *напр.*, в примере 3.

Были проведены анализы для оценки изменений в мРНК и уровнях белка после воздействия CoQ10 в ранее идентифицированных клетках. Изменения экспрессии мРНК анализировались с использованием ПЦР в режиме реального времени на микрочипах, специфичных для: апоптозов, оксислительного стресса и аксидантов, ангиогенеза и диабета. Изменения экспрессии белка анализировались с использованием анализа антител на микрочипах и иммуноблоттинга. Результаты этих анализов демонстрировали, в клеточных линиях в результате добавления коэнзима Q10 наблюдались значительные изменения экспрессии генов, на уровне как мРНК, так и белков. В результате обработки CoQ10 наблюдалась модуляция многочисленных генов, про которые было известно, что они связаны с процессами клеточного метаболизма или участвуют в них. Например, было обнаружено, что экспрессия белка ядерного рецептора HNF4A модулируется в клетках после обработки Q10. Экспрессия трансальдолазы 1 (TAL) также модулировалась в клетках, обработанных Q10. TAL балансирует уровни НАДФН и промежуточных продуктов реактивного кислорода, тем самым регулируя трансмембранный потенциал митохондрий, который критически важен для синтеза АТФ и выживания клеток. Имеющие особое значение для онкологических заболеваний, многие гены, известные как связанные с, напр., апоптозами, биологией рака и ростом клеток, были идентифицированы как регулируемые Q10. Примеры экспериментов описаны здесь детально, *напр.*, в примерах 4, 6, 7, 8 и 9.

Q10 является необходимым кофактором для возбуждения процессов фосфорилирования в митохондриях для вырабатывания энергии. Уровень коэнзима Q10, а также формы CoQ10, присутствующей в митохондриях, был

определен путем анализа богатых митохондриями препаратов из клеток, обработанных CoQ10. Подтвердилось, что уровень коэнзима Q10, присутствующего в митохондриях, возрастает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенного Q10. Время обработки коррелировало с множеством клеточных изменений, наблюдаемых в модуляции уровней мРНК и белков для определенных белков, связанных с путями метаболизма и апоптоза. Примеры экспериментов описаны здесь детально, *напр.*, в примере 5.

Результаты, описанные здесь, идентифицируют эндогенную молекулу CoQ10 как эпи-переключатель. В особенности результаты идентифицируют CoQ10 как вызывающую переключение в метаболическом статусе и частичное восстановление функций митохондрий в клетках. Эти заключения основываются на следующей интерпретации данных, описанных здесь, и существующих на настоящее время представлений в соответствующей области.

Известно, что Q10 синтезируется, активно транспортируется, накапливается и используется во внутренней мембране митохондрий. Известно также, что Q10 – необходимый кофактор в процессах окислительного фосфорилирования в митохондриях, вырабатывающих энергию. Однако в большинстве раковых клеток энергия вырабатывается преимущественно в процессе гликолиза, следующего за ферментацией молочной кислоты в цитоплазме, а не после окисления пирувата в митохондриях, как у большинства нормальных клеток. Окислительное фосфорилирование включает транспорт электронов комплексами и цитохромом с. Апоптозы включают разрушение митохондрий, когда про-апоптозные факторы вызывают повышенную проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Используя различные метаболические пути энергетического синтеза, раковые клетки способны ослаблять нормальную апоптозную реакцию на дефекты в клетке. Не имея намерения ограничиваться теорией, Заявители делают предположение, что Q10 функционирует, положительно регулируя белки пути окислительного фосфорилировани, таким образом возвращая митохондриальную функцию назад к состоянию, при котором распознаются онкогенетические дефекты и запускается апоптоз. Таким образом Q10 действует как эпи-переключатель, переключающий метаболический статус клетки.

Пример 18: Идентификация эпи-переключателя, связанного с онкологическим заболеванием

Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неместастазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; илиr SCC, плоскоклеточная карцинома; PaCa2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций перспективного эпи-переключателя. Изменения в клеточной морфологии/физиологии были оценены при исследовании чувствительности и апоптозного ответа клеток к перспективному эпи-переключателю. Эти эксперименты были проведены, как детально описано в примере 3. Вкратце, чувствительность клеточных линий к перспективному эпи-переключателю оценивалась путем мониторинга выживания клеток на различных временных точках и в диапазоне применяемых концентраций. Апоптозный ответ клеточных линий к перспективному эпи-переключателю оценивался с использованием, например, Nexin реагента в комбинации с методом проточной цитометрии. Nexin реагент содержит комбинацию двух красителей, 7AAD и Annexin-V-PE, и позволяет количественно определить популяцию клеток на ранних и поздних апоптозах. Дополнительное апоптозное исследование, в котором оцениваются однонитевые ДНК, может использовать, например, метод ApostrandTM ELISA. Чувствительность и апоптозный ответ больных и контрольных клеточных линий оценивались и сравнивались. Перспективные эпи-переключатели оценивались на основе их способности предпочтительно или выборочно ингибировать клеточный рост в раковых клетках по сравнению с нормальными или контрольными клетками. Перспективные эпи-переключатели в дальнейшем оценивались на основе их способности предпочтительно или выборочно вызывать апоптозы в раковых клетках по сравнению с нормальными или контрольными клетками.

Были проведены анализы для оценки изменений в уровнях мРНК и белков ранее идентифицированных клеток после обработки перспективным эпи-переключателем. Изменения уровней мРНК анализировались с использованием ПЦР в режиме реального времени на микрочипах. Эти эксперименты были проведены, как описано детально в примерах 6 и 9-13. Вкратце, мРНК выделялась

из клеток через различное время после воздействия. Уровни мРНК для генов, участвующих в специфичных путях, оценивались с использованием целевых анализов, включая, например, анализы, специфичные для апоптозов, окислительного стресса и антиоксидантной защиты, ангиогенеза, теплового шока или диабета. Гены, у которых транскрипция их мРНК менялась в два раза или больше, идентифицировались и оценивались.

Микрочип для антител (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скринингового исследования с помощью 700 белковых антител для оценки изменений в уровнях концентрации белков в обработанных Q10 клетках (SK-MEL-28, SCC). Экспрессия белка в клеточном экстракте устанавливалась, когда белок связывался с соответствующим антителом, помещенным на пластинку. Перед связыванием белки прямо метились флюоресцентным красителем, который потом использовался для флюоресцентной визуализации и количественного анализа. Исследование использовалось для сравнения белковых профилей экспрессии в двух образцах (исследуемый и референсный образцы), каждый метился различным Cy красителем (Cy3 или Cy5) и два образца использовались совместно в равных белковых концентрациях в исследовании. Интенсивность флюоресцентного сигнала для каждого образца затем записывалась отдельно на длине волны, соответствующей красящей метке образца, и сравнивалась.

Изменения в экспрессии белков анализируются с использованием анализов антител на микрочипах, 2-D гель-электрофорез анализов в совокупности с масс-спектроскопией, и анализов иммуноблоттингом. Эти эксперименты проводились, как детально описано в примерах 7, 4 и 8, соответственно. Вкратце, растворимый белок выделялся из клеток на различных временных точках, *напр.*, 6 часов или 24 часа, после чего обрабатывался перспективным эпи-переключателем. Изменения, вызванные в уровнях белков перспективным эпи-переключателем, оценивались с использованием микрочипа на антителах, содержащего антитела к примерно 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей. Дальнейшие дополнительные протеомичские анализы можно провести с использованием 2-мерного (2-D) гель-электрофореза в совокупности с методом масс-спектроскопии. Перспективный эпи-переключатель экзогенно добавлялся с клеточным линиям и клеточный осадок лизировался и подвергался 2-D гель-

электрофорезу. Гели анализировались для идентификации изменений в уровнях белков в обработанных образцах по сравнению с контрольными, необработанными образцами. Гели анализировались для идентификации изменений на разных временных точках обработки, для определения возросших уровней, снизившихся уровней или посттрансляционной модификации. Точки, показавшие статистически достоверные изменения, извлекались и подвергались белковой идентификации путем трипсинового расщепления и масс-спектроскопии. Охарактеризованные пептиды искались в белковой базе данных, например, с программами Mascot и MSRAT для идентификации белков. В добавление к предшествовавшим 2-D гель-анализам и экспериментам с антителами на микрочипах, потенциальные изменения уровней специфичеких белков, вызыванные возможной МВМ, могли быть оценены иммуноблоттингом. Во всех протеомических экспериментах белки с возросшими или снизившимися уровнями в различных клеточных линиях идентифицировались и оценивались.

Возможные эпи-переключатели оценивались на основе изменений, вызванных в экспрессии генов, в уровнях мРНК и/или белков, в клеточных линиях в следствие добавления возможного эпи-переключателя. В особенности по связи с онкологическими заболеваниями возможные эпи-переключатели оценивались на основе их способности модулировать гены, известные своей связью или включенностью в клеточные метаболические процессы.

Уровень возможного эпи-переключателя, также как форма возможного эпи-переключателя, присутствующая в клетке или в определенной клеточной локации опеделялась с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области. Например, уровень возможного эпи-переключателя в митохондриях в зависимости от времени и дозы определялся путем анализа богатых митохондриями препаратов из клеток, обработанных возможным эпи-переключателем. Уровни возможного эпи-переключателя в митохондриях на разных временных точках можно было сравнить и определить их корреляцию с другими наблюдаемыми клеточными изменениями, такими как модуляция уровней мРНК и белков для специфичных белков, связанных с метаболизмом и путями апоптоза.

Перспективные эпи-переключатели, которые, как наблюдалось, вызывали переключение метаболического статуса в клетке на основании результатов,

наблюдаемых в предыдущих экспериментах, идентифицируются как эпи-переключатели. Например, перспективный эпи-переключатель, который проявлял цитотоксичность и/или индуцировал апоптозы в клетках, идентифицировался как эпи-переключатель. Предпочтительно, перспективный эпи-переключатель, который проявлял различную цитотоксичность и/или по-разному вызывал апоптозную реакцию в больных (раковых) клетках по сравнению с нормальными клетками (напр., эпи-переключатель, который по-разному модулирует экспрессию белков, участвующих в апоптозах в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками), идентифицировался как эпи-переключатель.

Пример 19: Идентификация витамина D3 как эпи-переключателя

Витамин D3, или 1α, 25-дигидроксивитамин D3 (также известный как кальцитриол) является метаболитом витамина D, который синтезируется из витамина в двухэтапном энзимном процессе. Витамин D3 взаимодействует со своим повсеместным ядерным рецептором витамина D (VDR), регулируя транскрипцию широкого спектра генов, участвующих в кальциевом и фосфатном гомеостазе, а также в делении и дифференцировке клеток. Сообщалось, что витамин D3 обладает антираковым действием во многочисленных модельных системах, включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному простаты, рак яичников, молочной железы и легких (обзор Deeb *et al.* 2007 *Nature Reviews Cancer* 7:684-700).

Сообщалось, что антираковые эффекты витамина D3 участвуют во многих механимах, включая остановку роста на G1 фазе клеточного цикла, апоптозы, дифференцировку опухолевых клеток, разрушение посредников фактора роста - сигналов выживания клеток, и ингибирование ангиогенезов и клеточной адгезии (обзор Deeb *et al.* 2007 *Nature Reviews Cancer* 7:684-700). Например, сообщалось, уделяя особенное внимание апоптозам, что витамин D3 вызывает апоптозы, регулируя ключевые медиаторы апоптозов, такие как подавление экспрессии анти-апоптозов, белки пред-выживания BCL2 и BCL-XL, или вызывая экспрессию про-апоптозных белков (напр., BAX, BAK и BAD) (Deeb *et al.* 2007). В другом примере сообщалось, уделяя особенное внимание ангиогенезу, что витамин D3 ингибирует пролиферацию некоторых эндотелиальных клеток, имеющих опухолевое

происхождение, и ингбирирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который вызывает ангиогенез в опухолях (обзор Masuda и Jones, 2006 *Mol. Cancer Ther.* 5(4): 797-8070). В другом примере сообщалось, уделяя особенное внимание остановке клеточного цикла, что витамин D3 вызывает транскрипцию гена циклин-зависимой киназы ингибитора p21WAFI/CIPI и вызывает синтез и/или стабилизацию циклин-зависимой киназы ингибитора p27KIPI белка, которые чрезвычайно важны для индукции остановки G1. (Deeb *et al.* 2007)..

На основе предыдущих наблюдений витамин D3 идентифицировался как эпи-переключатель, *т.е.*, обладающий способностью переключать метаболический статус клетки. Витамин D3 является эпи-переключателем благодаря своей способности вызывать апоптозы в клетках и, в особенности, на основании его способности по-разному подавлять клеточный рост и вызывать апоптозную реакцию в больных (раковых) клетках по сравнению с нормальными клетками (*напр.*, по-разному модулировать экспрессию белков, таких как BCL-2, BCL-XL, и BAX, включенных в апоптозы, в раковых клетках по сравнению с нормальными).

Пример 20: Сравнительная чувствительность онкогенных и нормальных клеток к коэнзиму Q10

Определялось и сравнивалось действие обработки коэнзимом Q10 на различные линии онкогенных и нормальных клеток. Чувствительность клеток к коэнзиму Q10 оценивалась путем мониторинга индукции апоптозов. CoQ10 обработка клеток проводилась, как описано детально ниже в разделе материалы и способы. Индукция апоптозов в обработанных клетках оценивалась путем мониторинга индикаторов ранних апоптозов (*напр.*, Bcl-2 экспрессия, активация каспаз и путем использования анализа по аннексину V), как описано ниже. В этих исследованиях была определена минимальная дозировка CoQ10, *напр.*, концентрация CoQ10 и время обработки, требуемая для вызова апоптозов в ряде клеточных линий.

Неожиданным результатом было то, что данные показали, что эффективность обработки коэнзимом Q10 была выше в клеточных типах, которые

демонстрируют повышенный онкогенетический и/или высокий метастатический потенциал, *т.е.*, клеточные типы, которые образовались из более агрессивных раков или опухолей. Результаты этих исследований представлены ниже в таблице 29. Данные показывают, что CoQ10 более эффективен время- и дозозависимым образом в клетках, которые имеют более агрессивный раковый статус. Более того, в нормальных клетках наблюдался неожиданный отличный от раковых клеток эффект. Именно коэнзим Q10 неожиданно обнаружил слабую поддерживающую роль в нормальной клеточной среде, где у нормальных клеток наблюдалась повышенная пролиферация и миграция, включая кератиноциты и дермальные фибробласты.

Действие коэнзима Q10 на регуляцию генов и белковые механизмы отличается у раковых и нормальных клеток. Ключевые клеточные механизмы и компоненты, такие как мембранная проницаемость, транспортные механизмы, иммуномодуляция, ангиогенез, контроль клеточного цикла, геномная стабильность, окислительный контроль, гликолитический поток, метаболитический контроль и интеграция экстраклеточных матричных белков, дисрегулируются и таким образом генетическая и молекулярная карта клетки изменяется. Болезненная среда поддерживает управление клеточными контролирующими процессами. Данные, приведенные здесь, подтверждают, что CoQ10 запускает больший уровень эффективности (*напр.*, в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками, и в клетках с более агрессивным раковым статусом по сравнению с клетками менее агрессивного или неагрессивного ракового статуса), нормализуя некоторые ключевые вышеупомянутые процессы способом, который позволяет восстановить апоптозный потенциал.

Таблица 29: Минимальные концентрации и время обработки CoQ10, требующиеся для индукции ранних апоптозов в различных клеточных типах

Тканевое происхождение (Тип клеток)	**Индикация ранних апоптозов (Bcl-2, аннексин V, или активатор каспаз)**	**Концентрация (мкМ)**	**Время (ч)**	**Уровень агрессивности: 1 =**

				нормальная ткань 2 = злокачественная 3 = метастазирующая
КОЖА:				
Кератиноциты (*Heka, Hekn*)	Нет	Н/Д	Н/Д	1
Фибробласты (*nFib*)	Нет	Н/Д	Н/Д	1
Меланоциты (*Hema, LP*)	Нет	Н/Д	Н/Д	1
Меланома (*Skmel 28*)	Сильная	20	24	2
Меланома (Skmel 2)	Очень сильная	25	24	3
SCC, Плоскоклеточная карцинома	Очень сильная	25	24	3
МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА:				
MCF-7	Сильная	50	48	2
SkBr-3	Очень сильная	50	24	3
BT-20	Сильная	100	48	2
ZR-75	Слабая	200	72	2
MDA MB 468	Сильная	100	48	2
Маммарные фибробласты: 184A1 и 184B5)	Нет	Н/Д		1

(Lawrence Berkeley)				
ПРОСТАТА:				
PC3	Очень сильная	25	24	3
ПЕЧЕНЬ:				
HepG2	Очень сильная	50	24	3
Hep3B	Очень сильная	50	24	3
КОСТИ:				
Остеосаркома (143b)	Очень сильная	50	48	2
Саркома Юинга (NCI)	Исключительно сильная	5	1	3
ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА:				3
PaCa2	Очень сильная	25	24	
Сердце:				
Гладкие мускулы аорты (HASMC)	Нет	Н/Д	Н/Д	1

Материалы и способы

Подготовка и обработка клеток

Подготовка клеток в чашках или колбах

Клетки культивировались в T-75 колбах в соответствующей среде с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 1% PSA (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин B) (Invitrogen и Cellgro) в 37° C инкубаторе с 5% CO_2

до достижения 70-80% заселенности. Для сбора клеток для обработки в колбы добавили 1 мл трипсина, аспирировали, добавили дополнительные 3 мл трипсина и инкубировали при 37° С 3-5 минут. Клетки затем нейтрализовали равным объемом среды и получившийся раствор центрифугировали на 10000 об./мин. в течение 8 минут. Супернатант аспирировался, и клетки были ресуспендированы в 8,5 мл среды. Смесь 500 мкл ресуспензии и 9,5 мл изопропанола были приготовлены и было определено соответствующее число клеток, посаженных в каждую чашку. Опыты с контрольными группами и группами с концентрациями в диапазоне 0-200 мкМ были поставлены трижды. Из 500 мкМ CoQ-10 исходного раствора была осуществлена серия растворений для достижения экспериментальной концентрации в соответствующих чашках. Чашки инкубировались в 37° С инкубаторе с 5% CO_2 в течение 0-72 часов в зависимости от типа клеток и протокола экспериментов.

Выделение белка и количественный подсчет

Подготовка клеток в чашках

Следующий за обработкой клеток период инкубации был завершен, было осуществлено выделение белка. Чашки всех обработанных групп были промыты дважды 2мл, и однажды 1мл ледяного 1х фосфатного буферного солевого раствора (PBS). PBS был аспирирован из чашек только после 2-х промывок. Клетки были аккуратно собраны в микроцентрифужные пробирки с использованием конечного объема третьей промывки и центрифугированы на 10000 об./мин. в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант был собан и осадок был лизирован 50 мкл лизирующего буфера (1мкл протеазы и ингибитора фосфатазы на каждые 100 мкл лизирующего буфера). Пробы затем были заморожены на ночь при -20° С.

Подготовка клеток в колбах

Следующий за обработкой клеток период инкубации был завершен, было осуществлено выделение белка. Колбы всех обработанных групп были промыты дважды 5 мл, и однажды 3 мл ледяного 1х фосфатного буферного солевого раствора (PBS). PBS был аспирирован из чашек только после 2-х промывок. Клетки были аккуратно собраны в 15 мл микроцентрифужные пробирки с использованием конечного объема третьей промывки и центрифугированы на 10000 об./мин. в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант был

собан и осадок был лизирован в соответствующем количестве лизирующего буфера (1мкл протеазы и ингибитора фосфатазы на каждые 100 мкл лизирующего буфера). Объем лизирующего буфера зависел от количества осадка. Пробы были перенесены в микроцентрифужные пробирки и заморожены на ночь при -20° С.

Количественный подсчет белка

Пробы были разморожены при -4° С и обработаны ультразвуком для того, чтобы обеспечить гомогенизацию на следующий день после выделения белка. Количественная оценка белков была проведена с использованием микроBCA набора для белкового анализа (Pierce). Для приготовления проб для иммуноблоттинга был приготовлен 1:19 раствор бетамеркаптоэтанола (Sigma) для буфера (Bio-Rad). Пробы были разведены 1:1 с буферным раствором бетамеркаптоэтанола, нагреты при 95° С в течение 5 минут и заморожены на ночь при -20° С.

Иммуноблоттинг

Bcl-2, каспаза, 9, цитохром с

Объем проб для добавления был определен с использованием приближенной средней концентрации белка, наблюдаемой по BCA белковому анализу. Приблизительно 30-60 мкг белка было добавлено на каждую временную точку обработки. Белки были разделены с трехкратным повтором в 12% Tris-HCl готовом геле (Bio-Rad) или вручную сделанном геле в1х буфере при 85 и 100 вольт. Белки затем переносились на микроцеллюлозную бумагу на час при 100 вольт и блокировались еще на час в 5% растворе сыворотки. Мембраны были помещены в первичные антитела (1 мкл Ат:1000 мкл TBST) (Cell Signaling) на ночь при -4° С. На следующий день мембраны промывались три раза в течение десяти минут Tris-буферным солевым Tween-20 (TBST), и вторичные антитела (антикроличьи; 1мкл Ат: 1000 мкл TBST) были добавлены на час при -4° С. Мембраны снова были промыты трижды в течение десяти минут TBST и была сделана хемолюминисценция с использованием Pico или Femto субстрата (Pierce). Мембраны затем были обработаны во временных интервалах, которые давали лучшие визуальные результаты. После обработки мембраны хранились в TBST при -4° С до подсчета уровней актина.

Актин

Мембраны были помещены в первичные антитела к актину (1мкл Ат:5000 мкл TBST) (клеточный сигналинг) на 1 час при -4° С, промыты трижды по десять минут TBST, и вторичные антитела (мышиные; 1мкл Ат: 1000 мкл TBST) были добавлены на час при -4° С. Мембраны снова были промыты трижды в течение десяти минут TBST и была сделана хемолюминисценция с использованием Pico субстрата (Pierce). Мембраны затем были обработаны во временных интервалах, которые давали лучшие визуальные результаты.

Аннексин V анализ

Клетки промывались дважды в PBS10X и ресуспендировались в связывающем буфере (0,1 M HEPES, pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 мМ CaCl2). Пробы по 100 мкл были добавлены к культуральной пробирке с 5 мкл аннексин-ПЭ красителем или 7-ADD. Клетки были смешаны и инкубировались без света при комнатной температуре в течение 15 минут. После этого 400 мкл 1X связывающего буфера было добавлено к каждой пробе и их подвергли анализу путем проточной цитометрии.

Примеры 21-25, приведенные здесь, взяты из международной заявки WO 2008/116135. Полное содержание заявки включено сюда путем ссылки. Ради соблюдения последовательности номера этих примеров не меняются, но номера этих таблиц не связаны с таблицами, приведенными формуле изобретения.

Пример 21: Способ приготовления CoQ10 22% концентрата, который включает пентиленгликоль.

Концентрат был приготовлен с CoQ10 как липофильным биоактивным агентом. Около 10 килограмм (кг) полисорбата 80 было помещено в вакуумный выпарной аппарат и нагрето до температуры от около 50 °С до около 65 °С. Около 8,8 кг CoQ10 было добавлено к полисорбату 80 и для поддержания температуры от около 50 °С до около 65 °С был применен вакуум, и содержимое смешивалось около 15 минут. Получившийся в результате материал может называться здесь CoQ10 фазой или первой фазой. CoQ10 был растворен в полисорбате 80 в герметичном выпарном аппарате, при вакууме и температуре смеси полисорбата/CoQ10 от около 50 °С до около 55 °С.

В отдельном аппарате около 15,8 кг воды было нагрето до температуры от около 50 °С до около 55 °С и около 0,2 кг феноксиэтанола и около 2 кг

пентиленгликоля HYDROLITE 5®, USP были добавлены к воде и смешаны до достижения прозрачности и однородности. Затем было добавлено около 8 кг Фосфолипона® 85G перед диспергированием. Получившийся в результате материал может называться здесь водяной фазой или второй фазой. Водяная фаза достигла однородной дисперсии и гидратации лецитина Фосфолипон-типа и была добавлена к CoQ10/жидкому полисорбату, как описано ниже, при температуре от около 50 °C до около 55 °C.

Гомогинезатор Сильверсона, подобный tL4RT модели Сильверсона, применяемой для лабораторных партий, был использован для соединения двух фаз, описанных выше (*m.e.*, CoQ10 фазы и водяной фазы). ПРИМЕНЯЛСЯ гомогенизатор с использованием стандартного эмульсионного экрана и смешивания на полной мощности (от около 7000 об./мин. до около 10000 об./мин.) около 5 минут при закрытой рециркуляционной цепи и под вакуумом (от около 18 мм до около 20 мм Hg) при температурах от около 50 °C до около 55 °C с работающей мешалкой, пока растворенный CoQ10 не был полностью инкапсулирован и достиг однородной дисперсии, тем самым создав густую, однородную липосомную дисперсию. Получившийся в результате CoQ10 концентрат содержал CoQ10 в концентрации около 22% по весу. Концентрация Фосфолипона® 85G составляла около 8% по весу от общего веса композиции, то есть в комбинации с двумя фазами, описанными выше.

В отдельных экспериментах был произведен один кг лабораторной партии 22% CoQ10 концентрата, описанного выше, и во время гомогенизации брались образцы с 5-минутными интервалами. Размер частиц липосом образцов, взятых в разное время, определялся с использованием лазерного дифракционного оборудования (Malvern 2000) в соответствии с предписаниями производителя. Детали процесса гомогенизации и размеры частиц, наблюдаемые во время гомогенизации, представлены ниже в Таблице 1.

Таблица1

Время процесса (минуты)	Скорость головки гомогенизатора Сильверсона	Диаметр частиц (нм)	Интенсивность частиц, %, <300нм	Приблизительная температура, С

	L4RT			
5	7000	108	84,9	55
10	7000	162	57,8	65
15	7000	112	85,4	55
20	7000	149	67,0	62
30	7000	120	83,0	55
45	7000	107	85,0	55

Как можно видеть из Таблицы 1, с формулой концентрата CoQ10 и процессом, описанными выше, возможно производить липосомы со средним диаметром 107 нм и распределением частиц, при котором 85% от всех липосом производилось с размером от около 59 нм до около 279 нм. За короткое время процесса (около 5 минут) производится липосомная дисперсия CoQ10 точно так же эффективно, как за долгое время процесса (около 45 минут). Как можно также видеть из вышесказанного, оптимальные липосомные частицы наблюдаются, когда CoQ10 не подвергается температурам выше около 55°C.

Пример 22: Способ приготовления А 2% дисперсии карбомера

Дисперсия кросс-связанного полимера акриловой кислоты была приготовлена для использования как вязкий агент в составе крема. Используемая акриловая кислота, Карбомер 940, была приготовлена с 2% дисперсией со следующими компонентами, перечисленными ниже в таблице 2:

Таблица 2

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество (кг)
1	феноксиэтанол		0,500	0,0750
1	Гидролит-5		5,000	0,7500
2	Очищенная вода		92,500	13,8750
3	ACRITAMER 940	CARBOMER 940	2,000	0,3000

	Всего		100,000	15,0000

Процесс производства проходил следующим образом. Оборудование было вымыто и продезинфицировано. На лабораторном столе ингредиенты фазы 1 были смешаны до достижения прозрачности и однородности. Требуемое количество воды (фаза 2) было взвешено и добавлено к фазе в выпарном аппарате гомогенизатора, описанного выше в примере 1. Вода была нагрета в цилиндре с паровой рубашкой до температуры от около 60 °С до около 65 °С. Фаза 1 затем была добавлена к водной фазе 2 при средней скорости перемешивания до достижения прозрачности и однородности. Контейнер фазы 1 был промыт технологической водой и температура поддерживалась от около 60 °С до около 65 °С. Мешалка затем была запущена на большой скорости и был добавлен порошок Карбомер 940 (фаза 3).

Температура поддерживалась от около 60 °С до около 65 °С и смешивание продолжалось на средней скорости от около 500 об./мин. до около 800 об./мин. пока весь порошок Карбомера 940 не был добавлен. Порошок Карбомер медленно добавлялся в воронку смеси фаз 1 и 2. Порошок вручную медленно сыпался так, чтобы полное количество Карбомера было добавлено не менее чем за 10 минут.

Смешивание продолжалось при средней скорости мешалок, пока весь порошок не был полностью дисперсирован и не присутствовало “рыбьих глаз”. Процесс производства шел так, что весь не нейтрализованный порошок Карбомера 940 был полностью дисперсирован для достижения ровной полупрозрачной дисперсии или полностью гидратированного полимера Карбомера. Пермешиивание партии было достаточно высоким для того чтобы создать видимую воронку, но не настолько высоким, чтобы вызывать разбрызгивание. Правильное смешивание партии проводилось на высокой скорости от около 800 об./мин. до около 1300 об./мин. в течение периода времени от около 60 минут до около 90 минут. Температура партии подерживалась от около 60 °С до около 65 °С при начале смешивания и от около 55 °С до около 65 °С во время смешивания. Поддерживаемая температура способствовала дисперсии Карбомер полимера и помогала предотвратить агломерацию.

Партия была охлаждена до от около 25 °C до около 30 °C с охлажденной водой, пропущенной через паровую рубашку цилиндра, и смешивание продолжалось на средней скорости. Для микро определения качества, pH, удельной плотности и вязкости брались пробы.

Пример 23: Способ приготовления CoQ10 кремов (1,5%, 3,0% и 5,0%) с использованием 22% концентрата CoQ10

Эмульсионная основа крема была создана с использованием нескольких фаз в комбинации с содержащими концентрат CoQ10 липосомами примера 1. Фазы A, B, C и D были скомбинированы для образования основы крема. Фаза E была 22% концентратом CoQ10 примера1 (22% по весу CoQ10). Детали приготовления эмульсионной основы крема и последующего добавления 22% концентрата CoQ10 примера 1 перечислены ниже.

Для приготовления содержащего 1,5% по весу 22% концентрата CoQ10 ("CoQ10 крем 1,5%"), процедура комбинации различных фаз была проделана с ингредиентами, перечисленными в таблицах 3-7:

Табл.3

CoQ10 крем 1,5%

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
	RITOMOLLIENT TN	C12-15 Алкилбензоат	5,000	1,0000
	RITA CA	Цетиловый спирт	2,500	0,5000
	RITA SA	Стеариловый спирт	2,000	0,4000
	RITAPRO 165	Глицерилстеарат и PEG-100 Стеарат	4,500	0,9000

Фаза А (“жировая фаза”) включала C_{12-15} алкилбензоаты, которые являются легкими эфирами, добавленными для смягчения и растекаемости. Цетиловый спирт и стеариловый спирт были восками, добавленными для придания формы или текстуры крема, и глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарата смесь были основными эмульгаторами, включенными для формирования эмульсии масло-в-воде (м/в). Ингредиенты фазы А были взвешены в вакуумном выпарном аппарате и нагреты до температуры от около 70 °С до около 75 °С на водяной бане.

Табл. 4

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
B	RITA GLYCERIN	Глицерин	2,000	0,4000
B	HYDROLITE-5	Пентиленгликоль	2,125	0,4250
B	TRANSCUTOL P	Этоксидигликоль	5,000	1,0000
B	феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,463	0,0926
B	ACRITOMER 940, 2% дисперсия	Вода, КАРБОМФЕР 940	50,000	10,0000
B	Очищенная вода USP	Вода	11,000	2,2000

Фаза В (“водяная фаза”), содержала глицерин для увлажнения кожи, пропиленгликоль для увлажнения, придания коже проницаемости и для улучшения профиля микробиологической сохранности, этоксидигликоль для улучшения проницаемости кожи для CoQ10 липосом; феноксиэтанол для микробиологической сохранности; очиощенную воду в качестве фазы растворителя, и Карбомер 940 дисперсию примера 2 для контроля реологических

свойств формул кремов и для придания стабильности основной эмульсии.

Ингредиенты фазы B были помещены в отдельные вакуумные выпарные аппараты. Ингредиенты смешивались на средней скорости, при нагреве от около 70 °C до около 75 °C (без вакуума). Когда ингредиенты фазы B достигли температуры от около 70 °C до около 75 °C, ингредиенты фазы A были добавлены при температуре от около 70 °C до около 75 °C на средней скорости смешивания. Смесь фаз A и B рециркулировала в гомогенизаторе Сильверсона как описано выше в примере 1 (стандартный напор) до перехода к следующему этапу процесса.

Табл.5

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
C	TEALAN 99%	триэаноламин	1,300	0,2600
C	RITALAC LA USP	Молочная кислота	0,300	0,0600
C	RITALAC NAL	Лактат натрия, вода	2,000	0,4000
C	Дистиллированная вода	вода	3,312	0,6624

В фазе C (“нейтрализующая и буферная фаза”), очищенная вода действовала как растворитель и разбавитель для других ингредиентов этой фазы. Триэтаноламин был основным нейтрализатором сополимера акриловой кислоты Карбомер в водяной фазе (фазе B); раствор лактата натрия (60% по весу в воде) и молочной кислоты были добавлены в качестве буферной системы для создания и поддержания конечной pH крема от около 5 до около 5,5, что совпадает с естественным диапазоном pH кожи.

Ингредиенты фазы C были взвешены и смешаны до однородности и нагреты до температуры от около 60 °C до около 65 °C. Смесь фазы C была добавлена в вакуумный выпарной смеситель, содержащий фазы A и B с миксером

на скорости от средней до высокой.

Смешивание продолжалось до перехода к следующему этапу процесса.

Табл. 6

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
D	TITANIUM DIOXIDE	Диоксид титана	1,000	0,2000

Фаза D (“пигментная фаза”). Диспергируемый в воде порошок диоксида титана был использован в формуле только с целью осветления оттенка окончательного цвета крема. Желто-оранжевый цвет крема, который ему придал CoQ10, был заметно уменьшен и улучшен в косметических целях добавлением около 1% по весу диоксида титана.

Для фазы D процесса, взвешенный TiO_2 было добавлен в емкость (к фазам A, B и C) и смешан и рециркулирован в гомогенизаторе Сильверсона (высокий напор) около 10 минут или до полной однородности (цвет изменился до требуемого).

Важно было удостовериться, что нет агломерации или группирования диоксида титана на пластинах смесителя; это было потверждено визуальным осмотром. Гомогенизатор Сильверсона, как описано в примере 1, был использован с высоким напором для того чтобы добиться максимальной деагломерации и измельчения диоксида титана. Конечная дисперсия диоксида титана была проверена Hegman PH-175 грингометром.

Табл. 7

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
E	Концентрат	Вода,	7,500	1,500

	CoQ10 22% (из примера 1 выше)	Полисорбат 80, Убихинон, лецитин, пентиленгликоль, феноксиэтанол		
Итого			100,000	20,000

Рециркуляция была остановлена и емкость была охлаждена до от около 50 °C до около 55 °C при средней скорости смешивания, скорость около 30 об./мин.. Предварительно взвешенный 22% концентрат CoQ10 (фаза E) из примера 1 был нагрет до от около 45 °C до около 50 °C и добавлен в емкость (к фазам A, B, C и D).

Все фазы были смешаны на средней скорости около 60 об./мин. в вакууме до достижения однородности. Поддерживалась температура около 50 °C.

Емкость была охлаждена до от около 35 °C до около 45 °C при скорости смешивания около 60 об./мин. и использовании вакуума.

Получившийся в результате материал был помещен в контейнеры для хранения.

Для приготовления крема, содержащего 22% концентрат CoQ10 в количестве 3% (“CoQ10 крем 3% ”) по весу, была проведена точно такая же процедура, как и описанная для приготовления крема, содержащего 22% концентрат CoQ10 в количестве 1,5% (“CoQ10 крем 1,5%”) по весу. Материалы каждой фазы и использованные количества перечислены ниже в таблицах 8-12:

Табл.8

Крем CoQ10 3%				
Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
A	RITOMOLLIENT TN	C12-25 алкил бензоат	4,000	0,8000

A	RITA CA	Цетиловый спирт	2,500	0,5000
A	RITA SA	Стеариловый спирт	2,000	0,4000
A	RITAPRO 165	Глицерил стеарат и ПЕГ-100 стеарат	4,500	0,9000

Табл. 9

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
B	RITA GLYCERIN	Глицерин	2,000	0,4000
B	HYDROLITE-5	Пентилен гликоль	2,250	0,4500
B	TRACUTOL P	этоксиэтанол	5,000	1,0000
B	фегноксиэтанол	феноксиэтанол	0,463	0,0926
B	TRANSCUTOL 940, 2% дисперсия	Вода, CARBOMER 940	40,000	8,0000
B	Очищенная вода, USP	вода	15,000	3,0000

Табл. 10

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)

C	TEALAN 99%	триэтаноламин	1,300	0,2600
C	RITALAC LA	Молочная кислота	0,500	0,1000
C	RITALAC NAL	Лактат натрия, вода	2,000	0,4000
C	Очищенная вода, USP	вода	2,487	0,4974

Табл.11

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
C	TITANIUM DIOXIDE, #3328	Диоксид титана	1,000	0,2000

Табл.12

Фаза	Торговая марка	Название по CTFA	процент	Количество(г)
E	Концентрат CoQ10 22% (из примера 1 выше)	Вода POLYSORBATE 80, убихинон, лецитин, пентилен гликоль феноксиэтанол	15,000	3,0000
			100,000	20,000

Подобный крем был приготовлен с использованием CoQ10 22% концентрата из примера 1 в количетсве около 25% по весу для создания крема, имеющего CoQ10 22% концентрат в концентрации около 5% по весу.

Перечисление компонентов CoQ10 кремов, имеющих 1,5% CoQ10 по весу, 3% CoQ10 по весу, и 5% CoQ10 по весу приведены ниже в Таблицах 13, 14 и 15 соответственно. Следует заметить, что во всех формулах, приведенных здесь и ниже для CoQ10 кремов, фактически количество использованного CoQ10 22% концентрата превышало конечную теоретическую концентрацию CoQ10 22% концентрата на около 5% от целевой концентрации. Так, для "CoQ10 крема 1,5%" фактическое использованное количество было 7,5% по весу CoQ10 22% концентрата, что составляло 1,58% по весу CoQ10. "CoQ10 крем 3%" был сделан с 15% по весу CoQ10 22% концентрата, что составляло теоретическое количество 3,15% CoQ10 по весу. 5% дополнительного лекарства было добавлено для увеличения срока годности продукта и поддержания содержания лекарства от около 90% до около 110% от заявленного или ожидаемого содержания лекарства.

Табл.13

Крем CoQ10, 1,5%

Фаза	Торговая марка	INCL Название	процент	Поставщик
A	RITAMOLLIENT TN	C12-15 алкил бензоат	5,000	RITA
A	RITA CA	Цетиловый спирт	2,000	RITA
A	RITA SA	Стеариловый спирт	1,500	RITA
A	RITAPRO 165	Глицерил стеарат и ПЕГ-100 Стеарат	4,500	RITA

B	RITA GLYCERINE	Глицерин	2,000	RITA
	HYDROLITE 5	Пентилен гликоль	2,125	SYMROSE
B	TRANSCUTOL P	Этоксидигликоль	5,000	GATTEFOSSE'
B	феноксиэтанол	Феноксидигликоль	0,463	RITA
B	Очищенная вода	Деионизованная вода	11,000	
B	ACRITAMER 940 дисперсия,. 2%	Вода, пентилен гликоль, CARBOMER 940, феноксиэтанол	50,000	
C	Очищенная вода USP	Вода	4,212	
C	триэтаноламин	Триэтаноламин	1,300	RITA
C	RITALAC NAL	Лактат натрия и и вода	2,000	RITA
C	RITALAC LA USP	Молочная кислота	0,400	RITA
D	TITANIUM DIOXIDE #3328	Диоксид титана	1,000	MPSI
E	Концентрат Липосом CoQ10, 22масс% (из примера 1)	Вода POLYSORBATE 80 Ибихинон, лецитин, пентилен гликоль, феноксиетанол	7,500	

	итого		100,000	

Табл.14

Крем CoQ10, 3,0%

Фаза	нгредиенты					Масс.%
A	C12-15 алкил бензоат					4,000
A	Цетиловый спирт					2,000
A	Стеариловый спирт					1,500
A	Глицерил стеарат и ПЕГ стеарат					4,500
B	Глицерин					2,000
B	пентилен гликоль					2,250
B	Этоксидигликоль					5,000
B	феноксиэтанол					0,476
B	Карбомер					40,000
B	Очищенная вода					16,000
C	Лактат натрия					2,000
C	Очищенная вода					2,474

C	троиэтиламин					1,300
C	Молочная кислота					0,500
D	Диоксид титана					1,000
E	Концентрат Липосом CoQ10, 22масс% (из примера 1)					15,000
					Итого:	100,000

Таблица 15

CoQ10 крем 5%

Фаза	Ингредиент	масс. %
A	C12-C15 алкилбензоат	3.000
A	Цетиловый спирт	2.000
A	Стеариловый спирт	1.500
A	Глицерилстеарат и PEG100 стеарат	4.500
B	Глицерин	2.000
B	Пентиленгликоль	2.000
B	Этоксидигликоль	5.000
B	Феноксиэтанол	0.450
B	Карбомер	35.000

B	Очищенная вода	14.000
C	Лактат натрия	2.000
C	Очищенная вода	0.750
C	Триэтаноламин	1.300
C	Молочная кислота	0.500
D	Диоксид титана	1.000
E	CoQ10 концентрат 22%	25.000
	Всего:	100.000

Примечание: 5% производственное превышение CoQ10 22% концентрации было добавлено к партиям CoQ10 крема 1,5%, CoQ10 крема 3,0% и CoQ10 крема 5% (1,5% плюс 0,075%, 3% плюс 0,15%, и 5% плюс 2,5%).

Пример 24: Местное применение CoQ10 крема (1,5%, 3,0% или 5.0%)

Содержащие CoQ10 кремы, произведенные в примере 3 (*m.e.*, CoQ10 крем 1,5%, CoQ10 крем 3%, и CoQ10 крем 5%) выше были применены к коже свиней. Местное дозовое исследование проводилось на двух свиньях, один самец и одна самка. У каждого животного было 6 тестируемых областей; три тестируемых области с каждой стороны. У каждой свиньи на одну сторону (3 места) наносилась доза крема один раз в день в течение 7 дней, а на противоположную сторону (3 тестируемых области) каждой свиньи доза крема наносилась только один раз в 1 день. Кремы из примера 3, приготовленные с этоксидигликолем, использовались для самцов животных. Самки животных получали 3 тестируемых формулы, которые содержали те же ингредиенты, что и в образцах, произведенных в примере 3 выше, за исключением того, что они содержали 5% 1,3-бутиленгликоля

вместо 5% этоксидигликоля. Детали этих формул, сделанных с 1,3-бутиленгликолем, которые содержали 1,5% CoQ10 22% концентрата по весу, 3% CoQ10 22% концентрата по весу и 5% CoQ10 22% концентрата по весу, перечислены ниже в таблицах 16, 17, и 18 соответственно.

Таблица 16

Крем CoQ10 1.5% номинально активного основания бутиленгликоля

Фаза	Ингредиент	масс. %
A	C12-C15 алкилбензоат	5.000
A	Цетиловый спирт	2.000
A	Стеариловый спирт	1.500
A	Глицерилстеарат и PEG100 стеарат	4.500
B	Глицерин	2.000
B	Пентиленгликоль	2.125
B	Бутиленгликоль	5.000
B	Феноксиэтанол	0.463
B	Карбомер	50.000
B	Очищенная вода	11.001
C	Лактат натрия	2.000
C	Очищенная вода	4.211
C	Триэтаноламин	1.300
C	Молочная кислота	0.400
D	Диоксид титана	1.000

E	CoQ10 концентрат 22%	4.500
	Всего:	100.000

Таблица 17

Крем CoQ10 3% номинально активного основания бутиленгликоля

Фаза	Ингредиент	масс. %
A	C12-C15 алкилбензоат	4.000
A	Цетиловый спирт	2.000
A	Стеариловый спирт	1.500
A	Глицерилстеарат и PEG100 стеарат	4.500
B	Глицерин	2.000
B	Пентиленгликоль	2.250
B	Бутиленгликоль	5.000
B	Феноксиэтанол	0.476
B	Карбомер	40.000
B	Очищенная вода	16.000
C	Лактат натрия	2.000
C	Очищенная вода	2.474
C	Триэтаноламин	1.300
C	Молочная кислота	0.500
D	Диоксид титана	1.000

E	CoQ10 концентрат 22%	15.000
	Всего:	100.000

Таблица 18

Крем CoQ10 5% номинально активного основания бутиленгликоля

Фаза	Ингредиент	масс. %
A	C12-C15 алкилбензоат	3.000
A	Цетиловый спирт	2.000
A	Стеариловый спирт	1.500
A	Глицерилстеарат и PEG100 стеарат	4.500
B	Глицерин	2.000
B	Пентиленгликоль	2.000
B	Бутиленгликоль	5.000
B	Феноксиэтанол	0.450
B	Карбомер	35.000
B	Очищенная вода	14.000
C	Лактат натрия	2.000
C	Очищенная вода	0.750
C	Триэтаноламин	1.300
C	Молочная кислота	0.500

D	Диоксид титана	1.000
E	CoQ10 концентрат 22%	25.000
	Всего:	100.000

Все животные получили одинаковую дозу каждой формулы, каждая по 200 мг, на 121 $см^2$ области применения, один раз или ежедневно в течение 7 дней.

После применения образцы кожи были получены и анализированы следующим образом. Тестируемые области кожи были аккуратно промыты в смеси мягкого мыла и воды (*напр.*, 1% Ivory Soap в воде или эквивалент) чтобы удалить любые остатки местного тестируемой композиции. Если вырезанная область кожи была больше, чем область, получавшая дозу крема, то область, получавшая дозу крема, была помечена несмываемыми чернилами, чтобы отметить ту область кожи, которая получила дозу крема. Участок кожи полной толщины был вырезан скальпелем по размеру примерно 10 см x 10 см, на глубину, включавшую слой подкожной клетчатки. После вырезания участок кожи был разложен на плоской поверхности, завернут в два слоя целлофановой упаковки (SARAN WRAP.TM. или эквивалент), и быстро заморожен при температуре около -70 °C или ниже. Каждый участок кожи был идентифицирован надлежащим образом (напр., идентификационный номер животного, номер исследования, дата и т.д.) Образцы хранились при -70 °C или ниже до исследования.

Каждый участок кожи был помещен в водонепроницаемый пластиковый контейнер и разморожен в нем при температуре от около 30 °C до около 35 °C на водяной бане. После размораживания каждый участок кожи был аккуратно промыт дистиллированной деионизированной водой для удаления каких-либо поверхностных остатков средства и крови. Все подкожные ткани (*напр.* жировая) были удалены скальпелем до уровня папиллярной дермы.

Каждый участок кожи затем очищался (TRANSPORE.TM., от 3M) от около

10 до около 20 раз пока примерно 10-25% поверхности не стало блестеть. Этот процесс удалил роговой слой и какие-либо поверхностые остатки средства.

На каждом большом участке кожи были выделены чернилами 6 областей. Площадь выделенных областей составляла 1 $см^2$.

Каждый участок кожи был помещен в водонепроницаемый пластиковый контейнер и опущен в водяную баню при около 65 °C (+/-3 °C) для инициации процесса отделения эпидермиса от дермы. Тестируемые области затем вырезались из большого участка кожи, и эпидерма отделялась от дермы. Отдельные участки кожи взвешивались и вес записывался. Отдельные участки кожи были измельчены скальпелем, помещены в надписанные пробирки и хранились для последующих анализов.

Образцы кожи были экстрагированы в изопропаноле (IPA) на шейкере около 47 часов, затем хранились при около -20 °C до начала дальнейших процедур. Образцы затем центрифугировались при около 13500 об./мин. около 10 минут и супернатант был собран в 2 мл янтарные ампулы.

Количественная оценка CoQ10 была произведена при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-UV). Вкратце, ВЭЖХ была проведена на Hewlett-Packard 1100 Series ВЭЖХ системе с Agilent 1100 Series LC/MSD. Система растворителей, включавшая около 65% этанола и около 35% метанола, была пропущена через Aquasil C18 колонку (около 3 мм, около 100 мм, 5.mu.) при скорости потока около 1 мл/мин. Было введено десять микролитров на пробу. Пиковые области были подсчитаны для определения концентрации с использованием внешней стандартной кривой, приготовленной по стандарту. У кривой был резкий выброс на IPA из-за растворимости CoQ10 в воде.

Результаты содержания CoQ10 в коже свиней суммированы на фигурах 1 и 2, и в таблицах 19 и 20 ниже. 6 повторов на кусок кожи коррелировали с весом ткани и было получено среднее для каждой серии дозировок.

Таблица 19: средний ±SD вес ткани (n=42)

Донор	Эпидермис (граммы)	Дерма (граммы)
5061873 (самец)	0.037 ± 0.012	0.682 ± 0.129
5061521 (самка)	0.026 ± 0.007	0.603 ± 0.090

Таблица 20: среднее: ±SD полсчитанная концентрация CoQ10 в коже свиней (n=6/кусок)

Донор	Пол	Сторона	Доза (мг)	Эпидермис (мкг/г)	Дерма (мкг/г)
5061873	Самец	Левая	1.5	137.7 ± 58.2	0.72 ±1.12
5061873	Самец	Левая	3.0	188.7 ±40.3	< LLQ
5061873	Самец	Левая	5.0	163.4 ±39.1	0.16 ±0.39
5061873	Самец	Правая	1.5	519.3 ±101.2	0.93 ±0.81
5061873	Самец	Правая	3.0	315.3 ±227.0	< LLQ
5061873	Самец	Правая	5.0	331.2 ±128.7	< LLQ
5061873	Самец	Центр	0	24.6 ±11.5	< LLQ
5061521	Самка	Левая	1.5	135.6 ±39.2	< LLQ
5061521	Самка	Левая	3.0	211.8 ±60.5	< LLQ
5061521	Самка	Левая	5.0	211.9 ±67.8	< LLQ
5061521	Самка	Правая	1.5	118.4 ±32.6	< LLQ
5061521	Самка	Правая	3.0	84.7 ±24.6	< LLQ
5061521	Самка	Правая	5.0	118.1 ±26.6	< LLQ
5061521	Самка	Центр	0	25.7 ±21.8	< LLQ

<LLQ = ниже нижнего уровня возможного диапазона детекции (т.е., не определяется)

Данные показывают, что измеряемые количества CoQ10 наблюдались во всех эпидермальных образцах и в отдельных дермальных образцах.

Было обнаружено, что все обработанные участки эпидермиса содержали CoQ10 в уровнях, который был достоверно больше, чем в необработанных участках. ($p<0,001$).

Не было достоверной разницы между содержанием CoQ10 в эпидермисе по

трем использованным при обработке тремя концентрациям в участках кожи как самцов, так и самок. ($p>0,02$)

Между самцами и самками свиней, для участков с правой стороны животного (1-дневная обработка), содержание в эпидермисе для 1,5% CoQ10 и 5% CoQ10 обработок в участках из кожи самцов было достоверно выше, чем то, что наблюдалось в коже самок ($p<0,003$), но не для 3% CoQ10 обработки ($p=0,0329$). Таким образом, как можно видеть из этих данных, проникновение CoQ10 в однократной дозе было достоверно выше для этоксидигликолевой формулы по сравнению с бутиленгликолевой формулой ($p<0,003$ для 1,5% и 5% доз и $p=0,0329$ для 3% дозы).

Эпидермальные уровни для участков кожи как самцов, так и самок, для всех трех применявшихся доз, для 7-дневного периода обработки (левая сторона), были статистически идентичны.

Содержание в дерме наблюдалось только в участках кожи самцов для 1,5% CoQ10 и 5% CoQ10 применявшихся доз для 7-дневного периода обработки (левая сторона), и 1,5% CoQ10 применявшихся доз 1-дневного периода обработки (правая сторона).

Сводные данные представлены в Таблице 21:

% концентрации	1.5	3	5
Мкг лекарства / мг формулы	15	30	50
Примененное количество (мг)	200	200	200
Общее количество примененного лекарства (мкг)	3000	6000	10000
Обработанный участок ($см^2$)	121	121	121

Мкг лекарства/см^2	24.79	49.59	82.64
Самцы левая сторона (x7d)			
Эпидермис мкг/см^2	3.470	6.688	7.311
% доза/см^2	14.0	13.5	8.8
Дерма (мкг/ см^2)	0.575	0	0.106
% доза/см^2	2.3	0.0	0.1
Самцы правая сторона (x1d)			
Эпидермис мкг/см^2	18.309	8.215	10.986
% доза/см^2	73.8	16.6	13.3
Дерма (мкг/ см^2)	0.582	0	0
% доза/см^2	2.3	0.0	0.0

Если экстраполировать данные из таблицы 21 ко всему участку кожи, проникновение CoQ10 будет таким, как представлено ниже в таблице 22.

Табл. 22

	Если экстраполировать на всю область		
	1,5	3	5
Эпидермис (мкм/121см^2)	419,87	809,248	884,631

% дозы	14,0	13,5	8,8
	Если экстраполировать на всю область		
	1,5	3	5
Эпидермис			
(мкм/121см^2)	2215,389	994,015	1329,306
% дозы	73,8	16,6	13,3

Одноразовое применение формулы CoQ10 крема составляло в среднем 12%, 17%, или 70% от применяемой дозы для соответственно 5%, 3%, и 1,5% CoQ10 формул крема. Как правило, проникновение CoQ10 в однократной дозировке было достоверно выше для этоксидигликольной формулы по сравнению с бутиленгликольной формулой ($p<0,003$ для 1,5% и 5% доз и $p=0,0329$ для 3% дозы). Данные показывают, что существует возрастание эпидермального содержания при применяемой концентрации 3% CoQ10 по сравнению с 5% CoQ10 дозой, эквивалентной дозе 3% CoQ10. Это подтверждает, что кожа насыщается CoQ10 при 3% CoQ10 дозе, или же что ностель неспособен доставить больше CoQ10, чем в концентрации 3% CoQ10. Можно видеть, что уровни, достигнутые в коже после 7 дней местного применения, были идентичны у 2 животных.

Для формулы этоксидигликоля, и для однократного применения, наблюдалось среднее проникновекние 73,8%, 16,6%, и 13,3% для соответственно 1,5%, 3% и 5% этоксидигликоль содержащих кремов.

Интересным и неожиданным открытием было то, что диспропорциональное количество CoQ10, было обнаруженно в эпидермисе для 1,5% крема, самой низкой тестируемой дозы CoQ10. Не желая связываться какой-либо теорией, это усиленное проникновение CoQ10 могло быть функцией отношения CoQ10 к этоксидигликолю в формуле крема, или могло возможно быть

связано с отношением этоксидигликоля к CoQ10 и фосфолипидным липосомам. Сравнительно более высокое отношение этоксидигликоля к CoQ10, использованное в креме, содержащем более низкую концентрацию CoQ10, могло быть связанос более высокими количествами CoQ10, обнаруженными в эпидермисе.

1,5% крем и 3% крем также успешно прошли 9 недель ускоренных испытаний (хранение при около 35 °C и около 50 °C); прошли 5 циклов замораживания-разморозки при упаковке как в пластиковые банки, так и в металлические тубы, и прошли USP микробиологический тест. Результаты были подтверждены в той же системе с по-разному разработанными партиями и 1,5%, 3% и 5% весовыми концентрациями CoQ10 в прототипе основы формулы крема.

Пример 25: Способ формирования CoQ10 кремов (1,5%, 3,0% и 5,0%) с использованием CoQ10 21% концентрата

Кремы были произведены, как описано в примере 3 выше, за исключением того, что вместо пентиленгликоля был использован пропиленгликоль (1,2-пентан диол; Hydrolite-5, Symrise). Вначале был произведен концентрат, как описано в примере 1 выше, с компонентами, перечисленными в таблице 23:

Табл.23

Формула партии – концентрат CoQ 10

Фаза			
	Наименование сырья	Теоретическое значение	
		Масс.%	кг
A	Полисорбат 80 NF	25,000	5,000
A	ИбедекаренонUSP	21,000	4,200
B	Пропилен гликоль USP	10,000	2,000
B	Феноксиэтанол NF	0,500	0,100
C	Очищенная вода USP	35,500	7,100
C	Лецитин NF	8,000	1,600

	итого	100,000	20,000

Получившийся в результате CoQ10 концентрат (CoQ10 21% концентрат) содержал CoQ10 в концентрации около 21% по весу.

А дисперсия Карбомера была приготовлена, как описано в примере 2 выше, для использования в формировании крема с компонентами, перечисленными в таблице 24:

Таблица 24

Формула партии – дисперсия карбомера

Фаза	Название сырья	Теоретическое количество	
		Весовой %	Кг
A	Феноксиэтанол NF	0.500	0.0900
A	Пропиленгликоль USP	5.000	0.9000
B	Очищенная вода USP	92.500	16.6500
C	Карбомер 940 NF	2.000	0.3600
	Всего	100.000	18.000

Крем, имеющий 1,5% по весу CoQ10 21% концентрата и другой крем, имеющий 3% по весу CoQ10 21% концентрата были приготовлены, как описано выше в примере 3, с компонентами, перечисленными ниже в таблицах 25 и 26.

Таблица 25

Формула партии – крем CoQ10 1.5%

Фаза	Название сырья	Теоретическое количество	
		Весовой %	Кг
A	АлкилС12-15Бензоат NF	5.000	1.000
A	Цетиловый спирт NF	2.000	0.400

A	Стеариловый спирт NF	1.500	0.300
A	Глицерилстеарат и PEG-100 стеарат	4.500	0.900
B	Глицерин USP	2.000	0.400
B	Пропиленгликоль USP	1.750	0.350
B	Диэтиленгликоль моноэтиловый эфир NF	5.000	1.000
B	Феноксиэтанол NF	0.463	0.093
B	Дисперсия карбомера, 2%	50.000	10.000
B	Очищенная вода USP	8.377	1.675
B	Очищенная вода USP (для промывок)	3.000	0.600
C	Троламин NF	1.300	0.260
C	Молочная кислота USP	0.400	0.080
C	Раствор лактата натрия USP	2.000	0.400
C	Очищенная вода USP	4.210	0.842
D	Диоксид титана USP	1.000	0.200
E	CoQ10 концентрат, 21%	7.500	1.500
	Всего	100.00	20.00

Таблица 26

Формула партии – крем CoQ10 3%

Фаза	Название сырья	Теоретическое количество	
		Весовой %	Кг
A	АлкилС12-15Бензоат NF	4.000	0.800
A	Цетиловый спирт NF	2.000	0.400

A	Стеариловый спирт NF	1.500	0.300
A	Глицерилстеарат и PEG-100 стеарат	4.500	0.900
B	Глицерин USP	2.000	0.400
B	Пропиленгликоль USP	1.500	0.300
B	Диэтиленгликоль моноэтиловый эфир NF	5.000	1.000
B	Феноксиэтанол NF	0.475	0.095
B	Дисперсия карбомера, 2%	40.000	8.000
B	Очищенная вода USP	13.725	2.745
B	Очищенная вода USP (для промывок)	3.000	0.600
C	Троламин NF	1.300	0.260
C	Молочная кислота USP	0.500	0.100
C	Раствор лактата натрия USP	2.000	0.400
C	Очищенная вода USP	2.500	0.500
D	Диоксид титана USP	1.000	0.200
E	CoQ10 концентрат, 21%	15.000	3.000
	Всего	100.000	20.000

Пример 26: Способ формирования CoQ10 21% концентрата, который включает пропиленгликоль

Композиция концентрата CoQ10 21% была приготовлена путем комбинации фаз A и B, как описано ниже. Фаза A включала Убидекаренон USP (CoQ10) 21% (по весу) и полисорбат 80 NF 25% (по весу). Фаза B включала

пропиленгликоль USP 10,00 % (по весу), феноксиэтанол NF 0,50 % (по весу), лецитин NF (Фосфолипон 85G) 8,00 % (по весу) и очищенную воду USP 35,50 % (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 21% концентрата. Проценты и другие детали перечислены в следующей таблице.

Таблица 27a

Фаза	**Торговое название**	**INCI Name**	**Процент**
A	Ritabate 80	Полисорбат 80	25,000
A	Убидекаренон	Убихинон	21,000
B	Очищенная вода	Вода	35,500
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	10,000
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,500
B	Фосфолипон 85G	Лецитин	8,000
Общее			100,000

Феноксиэтанол и полипропиленгликоль были помещены в соответствующий контейнер и смешаны до достижения прозрачности. Требуемое количество воды было добавлено во второй контейнер (смесительный чан 1). Смесительный чан 1 во время смешивания был нагрет до температуры между 45 и 55 °C. Раствор феноксиэтанол/пропиленгликоль был добавлен к воде и смешан до достижения прозрачности и однородности. Когда содержимое водяной фазы в смесительном чане 1 находилось в диапазоне от 45 до 55 °C, Фосфолипон G был добавлен на скорости смешивания от низкой до средней. Чтобы избежать какого-либо пенообразования, содержимое смесительного чана 1 смешивалось до тех пор, пока Фосфолипон не стал однородно дисперсным. Полисорбат 89 был добавлен в соответствующий контейнер (смесительный чан 2) и нагрет до температуры между 50 и 60 °C. Затем в смесительный чан 2 был добавлен Убидекаренон. При поддержании температуры между 50 и 60 °C смесительный чан 2 смешивался до тех пор, пока весь Убидекаренон не растворился. После того как весь Убидекаренон растворился, водяная фаза была медленно добавлена в смесительный чан 2. Когда все материалы были соединены, содержимое было гомогенизировано, пока дисперсия не стала ровной и однородной. Соблюдая осторожность, чтобы не перегреть, температура поддерживалась между 50 и 60 °C. Гомогенизатор затем остановили и содержимое смесительного чана 2 было перемещено в соответствующий контейнер для хранения.

Пример 27: Способ формирования 0,5 кг партии CoQ10 21% концентрата, который включает пропиленгликоль

0,5 кг CoQ10 композиции концентрацией 21% было приготовлено путем комбинации фаз A и B, как описано ниже. Фаза A включала Убидекаренон USP (CoQ10) 21 % (по весу) и полисорбат 80 NF 25 % (по весу). Фаза B включала пропиленгликоль USP 8,00 % (по весу), феноксиэтанол NF 0,50% (по весу), лецитин NF (ФОСФОЛИПОН 85G) 8,00% (по весу) и очищенную воду USP 35,50% (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 21% концентрата. Проценты и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**INCI название**	**Процент**	**Количество (кг)**
A	Ritabate 80	Полисорбат 80	25,000	0,1250
A	Убидекаренон	Убихинон	21,000	0,1050
B	Очищенная вода	вода	35,500	0,1775
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	10,000	0,0500
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,500	0,0025
B	Фосфолипон 85G	Лецитин	8,000	0,0400
Общее			100,000	0,5000

Таблица 28a

Все оборудование было вымыто и продезинфицировано. Полисорбат 80 был взвешен прямо в выпарном аппарате РК-2 и нагрет в вакуумном выпарном аппарате РК-2 до 50-55 °С. Убидекаренон USP был взвешен на лабораторном столе и вес дважды проверен перед добавлением в емкость РК-2 (с выключенными мешалками). РК-2 был герметично закрыт. Герметично закрытый РК-2 смешивал на низкой скорости, поддерживая температуру 50-55 °С и вакуум в течение 15 минут. Фазу проверили, чтобы убедиться, что весь порошок растворился в полисорбате, перед тем как перейти к следующему этапу. В РК-1, требуемое количество воды было добавлено и нагрето до 50-55 °С. На лабораторном столе феноксиэтанол и Гидролит-5 были взвешены и смешаны до достижения прозрачности и однородности, и вода была добавлена при средней

скорости смешивания до достижения прозрачности и однородности. Когда водяная смесь достигла 50-55 °С, был добавлен лецитин при низкой или средней скорости смешивания, для избежания пенообразования, и смешивался до достижения диспергированности. Водяная фаза была перенесена из РК-1 в 5-галлоновый контейнер. С водяной фазой и CoQ10 фазой при 50-55 °С, водяная фаза была добавлена к CoQ10 фазе при средней скорости смешивания. Когда все материалы были перенесены в РК-2, партия была рециркулирована в аппарате Сильверсона со стандартной ножевой головкой при 7000 об./мин. в течение 3-5 минут с РК-2 выпарным аппаратом и в вакууме. Температура поддерживалась при 50-55 °С и не допускалось перегревание. Рециркуляцию остановили и партия была охлаждена при 30-35 °С при средней скорости смешивания. Концентрат был перекачан во временные переносные контейнеры.

Пример 28: Способ приготовления 20 кг партии CoQ10 21% концентрата, который включает пропиленгликоль

20 кг CoQ10 композиции концентрацией 21% было приготовлено путем комбинации ингредиентов фаз А, В и С. Фаза А включала полисорбат 80 NF 25% (по весу) и Убидекаренон USP (CoQ10) 21% (по весу). Фаза В включала пропиленгликоль USP 10,00% (по весу) и феноксиэтанол NF 0,50% (по весу). Фаза С включала очищенную воду USP 35,50% (по весу) и лецитин NF 8,00% (по весу). Проценты, количества и другие детали перечислены в следующей таблице:

Фазы	**RM Номер**	**Название сырья**	**Теоретическое количество**	
			% по весу	**г**
A	RM-002	RM-002: Полисорбат 80 NF	25,000	5000
A	RM-010	RM-010: Убидекаренон USP	21,000	4200
B	RM-021	RM-021: Пропиленгликоль USP	10,000	2000
B	RM-013	RM-013: Феноксиэтанол NF	0,500	100,0

C	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP	35,500	7100
C	RM-017	RM-017: Лецитин NF	8,000	1600
Всего			100,000	20000
Для очистки РК-2 (закрытый вакуумный сосуд)				
	RM-019 или RM-020	Азот 97% NF Азот NF	необх. кол-во	необх. кол-во

Таблица 29

Для приготовления 20 кг партии CoQ10 21% концентрата, оборудование было тщательно вымыто и проверено. Все оборудование было откалибровано. 100,0 г феноксиэтанола было взвешено и помещено в чистый стакан.

Для приготовления фазы В две тысячи грамм (2000 г) пропиленгликоля были взвешены и помещены в чистый 2 л SS стакан. Затем 2000 г очищенной воды было взешено и помещено в чистый контейнер, помеченный “вода для промывки.”

К 2 л SS стакану, содержащему предварительно взвешенные 2000 г пропиленгликоля, было добавлено 100 г предварительно взвешенного феноксиэтанола. Стакан, содержавший феноксиэтанол, был промыт в 2 л стакане с 1/3 воды для промывки. Содержимое 2 л стакана было перемешано лопаткой до достижения прозрачности и однородности и было помечено как Фаза В.

На следующем этапе было взвешено 1600 г лецитина и было взвешено 5100 г очищенной воды. Надлежащим образом помеченные партии веществ были помещены в устройства регистрации температуры TIC-1 для РК-1 и TIC-2 для РК-2. 5100 г очищенной воды было добавлено к РК-1 и вода была вручную нагрета в РК-1 до 50-55 °С. Мешалка была запущена на малой скорости оборотов. Раствор фазы В затем был медленно добавлен из 2 л SS стакана в РК-1. SS стакан затем был промыт с приблизительно 1/3 воды для промывки. Вода для промывки была медленно перемещена в РК-1. Температура поддерживалась вручную при 50-55 °С. Затем медленно был добавлен лецитин NF и смешивался до тех пор, пока не стал диспергированным. Температура поддерживалась вручную при 50-55 °С и

смешивание продолжалось, пока фаза B не была готова для переноса в РК-2.

Для приготовления фазы А, 5000 г полисорбата 80 было взвешено и помещено в чистый контейнер, и было взвешено 4200 г Убидекаренона USP. Для составления концентрата оборудование включало закрытый вакуумный сосуд (РК-2), гомогенизатор Сильверсона (Р-2) и насос Waukesha (Р-1). Вначале убедились, что нижний вентиль РК-2 закрыт. Предварительно взвешенные 5000 г полисорбата 80 были затем добавлены в РК-2 через отверстие в смотровом стекле. Смотровое стекло было закрыто на РК-2 после того как добавление было закончено.

Затем был включен РК-2 смеситель и полисорбат 80 вручную нагревался в РК-2 до 50-55 °С. Когда температура полисорбата 80 достигла нужного диапазона, 4200 г предварительно взвешенного Убидекаренона USP было добавлено через отверстие для доступа РК-2. Для удаления Убидекаренона, который налип на лопасти мешалки во время добавления, использовалась лопаточка. Когда добавление было завершено, смотровое окно было закрыто. Температура поддерживалась вручную при 50-55 °С, перемешивание длилось 15 минут. Содержимое РК-2 проверялось через смотровое стекло для оценки того, растворился ли Убидекаренон в полисорбате 80. РК-1 смеситель (А-1) был затем выключен.

Через отверстие для доступа РК-2, содержание РК-1 (фазы В) было добавлено к РК-2. Затем РК-1 был промыт оставшейся водой “вода для промывки.” РК-2 был вручную нагрет до 50-55 °С. Содержимое РК-2 затем рециркулировало в Р-1 и Р-2 Сильверсона с ножевой головкой в Р-2 на максимальных об./мин. в течение 5-10 минут. Вакуум был включен и поддерживался на максимуме для предотвращения пенообразования. Температура поддерживалась вручную при 50-55 °С.

Было взято четыре пробы: два образца по 30 г для Микро теста и два образца по 400 г для физического/химического анализа. Одна серия образцов была помечена как взятая. Продукт затем был перенесен в чистый HDPE закрытый контейнер. Размер партии составлял 20000 г.

Пример 29: Способ приготовления CoQ10 крема 1,5%

Композиция CoQ10 крема 1,5% была приготовлена путем комбинации фаз A-E, как описано ниже. Фаза A включала алкил C_{12-15} бензоат NF 5,000% (по весу), цетиловый спирт 2,000% (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5% (по весу) и стеариловый спирт NF 1,5% (по весу). Проценты и количество отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Name**	**Процент**
A	Ritamollient TN	C12-15 алкилбензоат	4,000
A	Rita CA	Цетиловый спирт	2,000
A	Rita SA	Стеариловый спирт	1,500
A	Ritapro 165	Глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарат	4,500

Таблица 30

Фаза B включала диэтиленгликоля моноэфир NF 5,000% (по весу), глицерин USP 2,000% (по весу), пропиленгликоль USP 1,750% (по весу), феноксиэтанол NF 0,463% (по весу), очищенную воду USP 11,377% (по весу) и 2% дисперсию карбомера 50,00 % (по весу). Проценты и количество отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**
B	Rita глицерин	Глицерин	2,000
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	1,750
B	Transcutol P	Этоксидигликоль	5,000
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,463
B	Acritamer 940, 2% дисперсия	Вода, Феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940	50,000
B	Очищенная вода USP	Вода	11,377

Таблица 31

Фаза C включала молочную кислоту USP 0,400% (по весу), раствор лактата натрия USP 2,000% (по весу), троламин NF 1,300% (по весу), и очищенную воду USP 4,210% (по весу). Проценты и количество отражены в следующей таблице.

Фаза	Торговое название	CTFA Название	Процент
C	TEAlan 99%	Триэтаноламин	1,300
C	Ritalac LA USP	Молочная кислота	0,400
C	Ritalac NAL	Лактат натрия, вода	2,000
C	Дистиллированная вода	вода	4,210

Таблица 32

Фаза D включала диоксид титана USP 1,000% (по весу). Фаза E включала CoQ10 21% концентрат, 7,50 % (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции 1,5% CoQ10 крема. Проценты и другие детали перечислены в следующих таблицах.

Фаза	Торговое название	CTFA Название	Процент
D	Диоксид титана, #3328	Диоксид титана	1,000

Таблица 33

Фаза	Торговое название	CTFA Название	Процент
E	CoQ10 21% концентрация	Вода, полисорбат 80, убихинон, лецитин, пропиленгликоль, феноксиэтанол	7,500

Таблица 34

При приготовлении композиции CoQ10 крема 1,5%, ингредиенты фазы A были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Ингредиенты фазы B, за исключением дисперсии карбомер, были добавлены в выпарной аппарат PK-2 и смешаны на средней скорости при нагреве между 70 и 80 °C. Ингредиенты фазы C были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Концентрат CoQ10 фазы E был добавлен в соответствующий контейнер и расплавлен при температуре между 50 и 60 °C с использованием водяной бани, при смешивании, необходимом для достижения однородности. Дисперсия карбомера была добавлена в соответствующий контейнер (емкость для смешивания) и нагрета до температуры между 70 и 80 °C во время смешивания. Продолжая смешивание, ингредиенты фазы B были добавлены к нагретой

дисперсии карбомера в емкость для смешивания, температура при этом поддерживалась. Продолжая смешивание, ингредиенты фазы C были добавлены к содержимому емкости для смешивания, температура при этом поддерживалась. Содержимое емкости постоянно перемешивалось и гомогенезировалось. Миксер затем был выключен, но гомогенизация продолжалась, пока ингредиенты фазы D добавлялись к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и ингредиенты смешивались и гомогенизировались до достижения полной однородности (проверка по цвету). Гомогенизатор затем был остановлен и партия была охлаждена при температуре между 50 и 60 °C. Миксер был затем выключен и расплавленный концентрат CoQ10 был добавлен к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и содержимое смешивалось/рециркулировало пока дисперсия не стала ровной и однородной. Содержимое емкости для смешивания затем было охлаждено при температуре между 45 и 50 °C. Охлажденное содержимое затем было перенесено в соответствующий контейнер для хранения перед упаковкой.

Пример 30: Способ приготовления 0,5 кг партии CoQ10 крема 1,5%

Композиция CoQ10 крема 1,5% была приготовлена путем комбинации фаз A-E, как описано ниже. Фаза A включала алкил C_{12-15} бензоат NF 5,000% (по весу), цетиловый спирт 2,000% (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5% (по весу) и стеариловый спирт NF 1,5% (по весу). Проценты, количество и другие детали отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
A	Ritamollient TN	C12-15 алкилбензоат	4,000	0,0250
A	Rita CA	Цетиловый спирт	2,000	0,0100
A	Rita SA	Стеариловый спирт	1,500	0,0075
A	Ritapro 165	Глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарат	4,500	0,0225

Таблица 35

Фаза B включала диэтиленгликоля моноэфир NF 5,000% (по весу),

глицерин USP 2,000% (по весу), пропиленгликоль USP 1,750% (по весу), феноксиэтанол NF 0,463% (по весу), очищенную воду USP 11,377% (по весу) и 2% дисперсию карбомера 50,00 % (по весу). Проценты, количество и другие детали отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
B	Rita глицерин	Глицерин	2,000	0,0100
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	1,750	0,0088
B	Transcutol P	Этоксидигликоль	5,000	0,0250
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,463	0,0023
B	Acritamer 940, 2% дисперсия	Вода, феноксиэтанол, пропиленгликоль, и карбомер 940	50,000	0,2500
B	Очищенная вода USP	Вода	11,377	0,0569

Таблица 36

Фаза C включала молочную кислоту USP 0,400% (по весу), раствор лактата натрия USP 2,000% (по весу), троламин NF 1,300% (по весу), и очищеннкю водк USP 4,210% (по весу). Проценты, количество и другие детали отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
C	TEAlan 99%	Триэтаноламин	1,300	0,0065
C	Ritalac LA USP	Молочная кислота	0,400	0,0020
C	Ritalac NAL	Лактат натрия, вода	2,000	0,0100
C	Дистиллированная вода	вода	4,210	0,0211

Таблица 37

Фаза D включала диоксид титана USP 1,000% (по весу). Фаза E включала CoQ10 21% концентрат, 7,500% (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции 1,5% CoQ10 крема. Проценты, количество и другие детали отражены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процен**	**Количе**

			т	**ство (кг)**
D	Диоксид титана, #3328	Диоксид титана	1,000	0,0050
E	CoQ10 21% концентрация	Вода, полисорбат 80, убихинон, лецитин, пропиленгликоль, феноксиэтанол	7,500	0,0375

Таблица 38

При приготовлении композиции CoQ10 крема 1,5%, ингредиенты фазы A были взвешены и нагреты до температуры между 70-70 °C на водяной бане. Ингредиенты фазы B были добавлены в выпарной аппарат PK-2 и смешаны на средней скорости при нагреве между 70-75 °C. Когда фаза B достигла 70-75 °C, фаза A была добавлена при 70-75 °C на средней скорости смешивания. Фазы A и B затем рециркулировали в аппарате Сильверсона. Ингредиенты фазы C были взвешены, смешаны и нагреты до 60-65 °C. Ингредиенты фазы C затем были добавлены в выпарной аппарат PK-2 с перемешиванием на средней скорости. При продолжении смешивания, фаза D была добавлена к партии в PK-2 выпарной аппарат. Партия постоянно смешивалась и рециркулировала в аппарате Сильверсона до достижения полной однородности.

Циркуляция была остановлена и партия была охлаждена при температуре между 50-55 °C с перемешиванием на средней скорости. После нагревания ингредиенты фазы E при температуре между 45 и 50 °C были добавлены к партии и партия смешивалась при вакууме на средней скорости до достижения однородности. Температура поддерживалась при 50 °C. Партия затем была охлаждена до 30-35 °C со скоростью перемешивания от низкой до средней и в вакууме. Затем партия была откачана в контейнер для хранения.

Пример 31: Способ приготовления 20 кг партии CoQ10 крема 1,5%

20 кг партии CoQ10 крема 1,5% были приготовлены путем комбинации фаз A-E. Проценты, количество и другие детали для каждой фазы отражены в следующей таблице.

Фаза	**RM номер**	**Название сырья**	**Теоретическое количество**	
			% по весу	**г**
A	RM-026	RM-026: Каприновый/каприлиновый триглицерид	5,000	1000,0
A	RM-003	RM-003: Цетиловый спирт NF	2,000	400,0
A	RM-005	RM-005: Стеариловый спирт NF	1,500	300,0
A	RM-016	RM-016: Глицерин Стеарат/ПЭГ-100 Стеарат	4,500	900,0
B	RM-001	RM-001: Глицерин USP	2,000	400,0
B	RM-021	RM-021: Пропиленгликоль USP	1,750	350,0
B	RM-007	RM-007: Диэтиленгликоля моноэтиловый эфир NF	5,000	1000,0
B	RM-013	RM-013: Феноксиэтанол NF	0,465	93,0
B	IP-003	IP-003: Дисперсия карбомера, 2%	50,000	10000,0
B	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP	8,375	1675,0
B	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP (для промывки)	3,000	600,0
C	RM-009	RM-009: Троламин NF	1,300	260,0
C	RM-006	RM-006: Молочная кислота USP	0,400	80,0

C	RM-012	RM-012: Раствор лактата натрия USP, 60%	2,000	400,0
C	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP	4,210	842,0
D	RM-008	RM-008: Диоксид титана USP	1,000	200,0
E	IP-004	IP-004: CoQ10 концентрат, 21%	7,500	1500,0
		Всего	**100,00**	**20000, 0**
Для очистки РК-2 (Вакуумная емкость)				
	RM-019 or RM-020	Азот 97% NF или Азот NF	необх. кол-во	необх. кол-во

Таблица 39

Реактивы были взвешены в кювету с особой аккуратностью для избежания рассыпания. Вначале было взвешено 200 г диоксида титана (фаза D). Затем 600 г очищенной воды было взвешено и помечено как "вода для смывания – Фаза B".

При приготовлении фазы A 1000 г капринового/каприлинового триглицерида, 400 г цетилового спирта NF, 300 г стеарилового спирта NF, и 900 г глицерилстеарата /ПЭГ-100 было взвешено. Эти предварительно взвешенные ингредиенты фазы A затем были добавлены в 4 л SS стакан и контейнер помечен как фаза A. Следует заметить, что эта предсмесь должна быть использована в течение 24 часов. Контейнер с фазой A затем был закрыт и отставлен для более позднего использования.

Для приготовления фазы B, 10000 г 2% дисперсии карбомера, как в примере 11A, было взвешено. Затем было добавлено 400 г глицерина USP, 350 г пропиленгликоля, 1000 г диэтиленгликоля моноэтилэфира NF и 93 г феноксиэтанола NF. 1675 г очищенной воды было взвешено и контейнер был помечен как "очищенная вода для фазы B". Эти предварительно взвешенные ингредиенты фазы B были добавлены в 10 л SS стакан и помечены как фаза B. Следует заметить, что эта предсмесь должна быть использована в течение 24 часов. Контейнер с фазой A затем был закрыт и отставлен для более позднего использования.

Для приготовления фазы С, 260 г триэтаноламина NF, 400 г раствора лактата натрия USP, 60%, 842 г очищенной воды (помеченной как “очищенная вода для фазы С”), и 80 г молочной кислоты USP было взвешено. Эти предварительно взвешенные ингредиенты фазы С были затем добавлены в 2 л SS стакан для следующей процедуры: (1) 260 г триэтаноламина, (2) 400 г раствора лактата натрия, 60%, (3) 842 г очищенной воды USP для фазы С и (4) 80 г молочной кислоты USP. Следует заметить, что предсмесь следует использовать в течение 24 часов. Содержимое контейнера фазы С затем было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Контейнер фазы С был закрыт и отставлен для позднейшего использования.

Для приготовления фазы Е, 1500 г CoQ10 21% концентрата было взвешено и помещено в контейнер для фазы Е и отставлено для позднейшего использования.

Для приготовления 20 кг партии CoQ10 крема 1,5% были подготовлены 2 водяные бани. Стакан фазы А был помещен на водяную баню при 70-75 °С и содержимое было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Стакан фазы С был затем помещен на водяную баню при 60-65 °С и содержимое стакана фазы С было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Подобным образом стакан фазы Е был помещен на водяную баню при 50-55 °С. Содержимое контейнера фазы Е было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности.

Дополнительное использованное оборудование включало водяную баню (Е-1), закрытую вакуумную емкость (РК-2), насос Waukesha (Р-1) и ножевую головку для гомогенизатора Сильверсона.

Вначале убедились, что нижний вентиль РК-2 закрыт и что РК-2 должным образом закрыт. Смотровое стекло было затем убрано. Предварительно взвешенные 10000 г 2,0% дисперсии карбомера были затем добавлены в РК-2 через отверстие в смотровом стекле. Лопаточка использовалась для переноса 2,0% карбомера дисперсии со стенок контейнера. TIC-2 (указатель температуры) для РК-2 был затем включен для гарантии правильности операции. Смеситель для РК-2 (А-2) затем был включен и 2,0% дисперсия карбомера в РК-2 нагревалась с паровой рубашкой до 70-80 °С. Вакуум был выключен. Смотровое стекло затем было вынуто из РК-2 и фаза В из SS стакана была медленно добавлена в РК-2 через отверстие смотрового стекла. Контейнер фазы В затем был промыт “водой

для промывки фазы B." Промывочная вода была добавлена в РК-2 через отверстие смотрового стекла. Фаза А была затем медленно добавлена к РК-2. Лопаточка использовалась для переноса фазы А со стенок контейнера в SS стакан. Надо заметить, что температура фазы А должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2. Нижний вентиль РК-2 затем был открыт. Р-1 (насос Waukesha) и Р-2 (гомогенизатор Сильверсона) были включены и содержимое РК-2 (вакуумная емкость) были гомогенизированы. Фаза С была медленно добавлена в РК-2 через отверстие для доступа. Надо заметить, что температура должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2. Затем удостоверились, что гомогенизатор работал более 5 минут, прежде чем А-2 (смеситель) был выключен. Предварительно взвешенные 200,0 г диоксида титана фазы затем были медленно засыпаны через 100 ячеечное сито в РК-2. Лопаточка использовалась для того чтобы убрать весь диоксид титана, который налип на лопасти РК-2.

Смотровое стекло затем было вынуто и включен А-2. Содержимое продолжало перемешиваться во время рециркулирования через Р-1 (насос Waukesha) и Р-2. Содержимое было гомогенизировано в течение 10 минут или до достижения полной однородности (проверка цвета). Р-2 был остановлен через 10 минут. Содержимое РК-2 было охлаждено до 50-60 °С. Смотровое стекло было вынуто, и расплавленный CoQ10 21% концентрат (фаза Е, как в Примере 7А) был медленно добавлен к РК-2. Смотровое стекло затем было помещено обратно.

Содержимое РК-2 было смешано до достижения однородности и рециркулировано Р-1. Температура поддерживалась на уровне 50-60 °С. Начали пропускание потока азота NF и затем С-2 (вакуумный насос) был включен. Следует заметить, что лучше избежать образования пены продукта. Партия затем была охлаждена до 45-50 °С и были включены вакуум и азот NF. Когда продукт охладили до нужной температуры, С-2 был выключен и вакуум и азот NF были ослаблены. Поток азота NF закончился. Выпускной вентиль затем был очищен от продукта перед тем как собрать пробы или упаковать продукт. Продукт был перенесен в предварительно взвешенные, чистые, ПЭНД закрытые контейнеры. А-2, Р-1 и поток азота NF были выключены и партия была закончена и помечена как TIC-2.

Было взято две 30 г (минимум) проб для микротеста и два образца по 400 г (минимум) для физического/химического анализа. Одна серия образцов была

помечена как «взято». Наполненные контейнеры были взвешены. Размер партии составлял 20000 г.

Пример 32: Способ приготовления 18 кг партии дисперсии карбомера 2%

18 кг композиции партии 2,0% дисперсии карбомера было приготовлено путем комбинации фаз A-C, как описано ниже. Фаза A включала пропиленгликоль USP 0,50% (по весу) и феноксиэтанол NF 5,00% (по весу). Фаза B включала очищенную воду USP 92,50% (по весу), а фаза C включала Карбомер 940 NF 2,00% (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 крема 2%. Проценты и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
A	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	5,00	0,9
A	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	0,500	0,09
B	Очищенная вода, USP	Очищенная вода	92,500	16,65
C	Acritamer 940	Карбомер 940 NF	2,000	0,3600
	Всего		100,000	18,00

Таблица 40

В соответствующем контейнере ингредиенты фазы A были смешаны до достижения прозрачности и однородности. Во второй контейнер (емкость для смешивания) была добавлена очищенная вода фазы B. Порция очищенной воды (“вода для промывки”) была оставлена для промывания контейнера фазы A. Вода во втором контейнере была нагрета до температуры между 60 и 65 °C. Ингредиенты фазы A были добавлены к воде фазы B и “вода для промывания” использовалась для промывания контейнера фазы A. Содержимое контейнера фазы A затем было смешано до достижения прозрачности и однородности.

Скорость миксера была повышена во время медленного добавления (засыпания) карбомера 940 фазы С в емкость для смешивания. Смешивание продолжалось, пока весь порошок не был полностью дисперсирован и не было присутствия “рыбьих глаз”. Температура поддерживалась между 60 и 65 °С. Содержимое затем было перенесено в соответствующий контейнер для хранения.

Пример 33: Способ приготовления 3 кг партии дисперсии карбомера 2%

3 кг композиции партии 2,0% дисперсии карбомера было приготовлено путем комбинации фаз А-С, как описано ниже. Фаза А включала пропиленгликоль USP 5,00% (по весу) и феноксиэтанол NF 0,50% (по весу). Фаза В включала очищенную воду USP 92,50% (по весу), а фаза С включала Карбомер 940 NF 2,00% (по весу). Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 крема 2%. Проценты и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
А	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,500	0,0150
А	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	5,000	0,1500
В	Очищенная вода, USP	Вода	92,500	2,7750
С	Acritamer 940	Карбомер 940	2,000	0,0600
	Всего		100,000	3,0000

Таблица 41

Все оборудование было чистым и продезинфицированным. На лабораторном столе ингредиенты фазы А были смешаны до достижения прозрачности и однородности. Требуемое количество воды было взвешено и добавлено к выпарному аппарату РК-1 (резервуар фазы). Вода в РК-1 была нагрета с паровой рубашкой до 60-65 °С. Фаза А была добавлена к фазе В при среднем смешивании до достижения прозрачности и однородности. Контейнер с

фазой А был промыт соответствующей водой при поддержании температуры 60-65 °С. Смешивание продолжалось при средней-высокой скорости пока весь порошок не был был полностью дисперсирован и не было присутствия “рыбьих глаз”. Из содержимого были взяты микро пробы на качество, pH, удельную плотность и вязкость. Партия затем была отобрана насосом в чистую и продезинфицированный 5-галлоновую закрытую бутыль, pH, удельная плотность и вязкость соответствовали спецификациям.

Пример 34: Способ приготовления 18 кг партии дисперсии карбомера 2%

18 кг партии дисперсии карбомера 2,0% было приготовлено путем комбинации фаз А, В и С. Фаза А включала феноксиэтанол NF 0,50% (по весу), пропиленгликоль USP 5,00% (по весу), очищенную воду USP 92,50% (по весу) и включала Карбомер 940 NF 2,00% (по весу).

Фаза	**RM Номер**	**Название сырья**	**Теоретическое количество % по весу**	**GMS**
A	RM-013	Феноксиэтанол NF	0,500	90,0
A	RM-021	Пропиленгликоль USP	5,000	900
B	RM-011	Очищенная вода USP	92,500	16650
C	RM-004	Карбомер 940 NF	2,000	360
		Всего	100,000	18000

Таблица 41

Оборудование, использованное в приготовлении этой партии, включало весы Sartorius, весы Mettler, регистрирующее устройство, закрытую фазовую емкость и 2 л стакан из нержавеющей стали (SS).

Перед взвешиванием ингредиентов рабочая зона была вымыта и проверена. Все оборудование было тщательно очищено, проверено и откалибровано. Калибровка весов была проверена и записана. Контейнеры для взвешивания были взвешены для избежания разбрызгивания во время взвешивания. Вначале 1650 г очищенной воды было взвешено и помещено в контейнер, помеченный “вода для

промывки.” Другие 15000 г очищенной воды также были взвешены. 360 г Карбомера 940 NF также были взвешены.

Фаза А была приготовлена путем взвешивания 90 г феноксиэтанола в стакан. 900 г пропиленгликоля USP затем было взвешено в 2 л SS стакан. Предварительно взвешенный феноксиэтанол NF был затем добавлен в 2 л SS стакан, содержащий предварительно взвешенный пропиленгликоль. Остаток феноксиэтанола, остававшийся в стакане, был смыт приблизительно 1/3 “воды для промывки”. Контейнер был затем помечен как фаза А. Следует заметить, что предварительная смесь должна быть использована в течение 24 часов.

Фаза А была смешана лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Лопаточка была затем промыта 1/3 “воды для промывки”

После приготовления фазы А дисперсия была смешана с использованием закрытой фазовой емкости (РК-1). Должным образом помеченное устройство было помещено в TIC-1 (температурный регистратор). TIC-1 (Honeywell Temperature Recorder) был включен и обеспечил правильную работу. После проверки, что нижний клапан РК-1 закрыт, предварительно взвешанная очищенная вода USP была добавлена к РК-1. SS стакан был промыт в РК-1 с оставшейся “водой для промывки.”

Смеситель был включен на среднюю мощность и содержимое РК-1 было нагрето с паровой рубашкой до 60-65 °С. Подходящие диапазоны также включают 55-70 °С. Смеситель был поставлен на самую быструю скорость, не вызывавшую разбрызгивания. Предварительно взвешенный Карбомер 940 NF был равномерно засыпан через 50 ячеечное сито в РК-1 за период времени не менее 15 минут, но не более 20 минут. Температура поддерживалась на уровне 60-65 °С, однако подходящий диапазон составляет 55 - 70 °С. Смеситель затем был включен на более быструю скорость. Смешивание продолжалось не менее 1 часа при быстрой работе смесителя, пока весь порошок не стал дисперсным и не было присутствия «рыбьих глаз». Лопаточка была использована для того чтобы дисперсировать весь порошок, который налип на лопасти вортекса.

Было взято две 30 г пробы для микротеста и два образца по 400 г (для физического/химического анализа. Одна серия образцов была помечена как «взято». Продукт был перенесен в чистые, HDPE закрытые контейнеры. Размер партии составлял 18000 г.

Пример 35: Способ приготовления CoQ10 крема 3%, который включает CoQ10 21% концентрат и алкилбензоат

Композиция CoQ10 крема 3% была приготовлена путем комбинации следующих фаз. Фаза A включала алкил C_{12-15} бензоат NF 4,00% (по весу), цетиловый спирт 2,00% (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,50% (по весу) и стеариловый спирт NF 1,5% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**
A	RITAMOLLIENT TN	C12-15 алкилбензоат	4,000
A	Rita CA	Цетиловый спирт	2,000
A	Rita SA	Стеариловый спирт	1,500
A	Ritapro 165	Глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарат	4,500

Таблица 43

Фаза B включала диэтиленгликоля моноэфир NF 5,00% (по весу), глицерин USP 2,00% (по весу), пропиленгликоль USP 1,50% (по весу), феноксиэтанол NF 0,475% (по весу), очищенную воду USP 16,725% (по весу) и 2% дисперсию карбомера 40,00% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**
B	RITA Глицерин	Глицерин	2,000
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	1,500
B	Transcutol P	Этоксидигликоль	5,000
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,475
B	Acritamer 940, 2% дисперсия	Вода, феноксиэтанол, пропиленгликоль, карбомер 940	40,000
B	Очищенная вода,	вода	16,725

	USP		

Таблица 44

Фаза C включала молочную кислоту USP 0,50% (по весу), раствор лактата натрия USP 2,00% (по весу), троламин NF 1,30% (по весу), и очищенную воду USP 2,50% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**
C	Tealan 99%	Триэтаноламин	1,300
C	Ritalac LA	Молочная кислота	0,500
C	Ritalac NAL	Лактат натрия, вода	2,000
C	Очищенная вода, USP	Вода	2,500

Таблица 45

Фаза D включала диоксид титана USP 1,00% (по весу), а фаза E включала CoQ10 21% концентрат 15% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**
D	Диоксид титана, #3328	ДИОКСИД ТИТАНА	1,000
E	CoQ10 концентрация 21%	Пропиленгликоль, полисорбат 80, убихинон, вода, феноксиэтанол	15

Таблица 46

Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 крема 3% .

Ингредиенты фазы A были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Ингредиенты фазы B, за исключением дисперсии карбомера, были добавлены в РК-2 выпарной аппарат

и смешаны на средней скорости при нагреве между 70 и 80 °С. Ингреидиенты фазы С были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °С на водяной бане. Концентрат CoQ10 фазы Е был добавлен в соответствующий контейнер и расплавлен при температуре между 50 и 60 °С с использованием водяной бани, при смешивании, необходимом для достижения однородности. Дисперсия карбомера была добавлена в соответствующий контейнер (емкость для смешивания) и нагрета до температуры между 70 и 80 °С во время смешивания. Продолжая смешивание, ингредиенты фазы В были добавлены к нагретой дисперсии карбомера в емкость для смешивания, температура при этом поддерживалась. Содержимое емкости постоянно перемешивалось и гомогенезировалось. Миксер затем был выключен, но гомогенизация продолжалась, пока ингредиенты фазы D добавлялись к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и ингредиенты смешивались и гомогенизировались до достижения полной однородности (проверка по цвету). Гомогенизатор затем был остановлен и партия была охлаждена при температуре между 50 и 60 °С. Миксер был затем выключен и расплавленный концентрат CoQ10 был добавлен к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и содержимое смешивалось/рециркулировало пока дисперсия не стала ровной и однородной. Содержимое емкости для смешивания затем было охлаждено при температуре между 45 и 50 °С. Охлажденное содержимое затем было перенесено в соответствующий контейнер для хранения перед упаковкой.

Пример 36: Способ приготовления 0,5 кг CoQ10 крема 3%, который включает CoQ10 21% концентрат и алкилбензоат

0,5 кг партии CoQ10 крема 3,0% было приготовлено путем комбинации следующих фаз. Фаза А включала алкил C_{12-15} бензоат NF 4,00% (по весу), цетиловый спирт 2,00% (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,50% (по весу) и стеариловый спирт NF 1,5% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
A	Caprylic	C_{12-15} алкил бензоат	4,000	0,0200
A	Rita CA	Цетиловый спирт	2,000	0,0100

A	Rita SA	Стеариловый спирт	1,500	0,0075
A	Ritapro 165	Глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарат	4,500	0,0225

Таблица 47

Фаза B включала диэтиленгликоля моноэфир NF 5,00% (по весу), глицерин USP 2,00% (по весу), пропиленгликоль USP 1,50% (по весу), феноксиэтанол NF 0,475% (по весу), очищенную воду USP 16,725% (по весу) и 2% дисперсию карбомера 40,00% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены для соответствующей фазы в таблице ниже.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
B	Rita глицерин	Глицерин	2,000	0,0100
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	1,500	0,0075
B	Transcutol P	Этоксидигликоль	5,000	0,0250
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,475	0,0024
B	Acritamer 940, 2% дисперсия	Вода, феноксиэтанол, пропилен гликоль, карбомер 940	40,000	0,2000
B	Очищенная вода, USP	Вода	16,725	0,0836

Таблица 48

Фаза C включала молочную кислоту USP 0,50% (по весу), раствор лактата натрия USP 2,00% (по весу), троламин NF 1,30% (по весу), и очищенную воду USP 2,50% (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
C	Tealan 99%	Триэтаноламин	1,300	0,0065
C	Ritalac LA	Молочная кислота	0,500	0,0025
C	Ritalac NAL	Лактат натрия, вода	2,000	0,0100

C	Очищенная вода, USP	Вода	2,500	0,0125

Таблица 49

Фаза D включала диоксид титана USP 1,00 % (по весу), а фаза E включала CoQ10 21% концентрат 15 % (по весу). Проценты, количество и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фазы	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
D	Диоксид титана, #3328	Диоксид титана	1,000	0,0050
E	CoQ10 21% концентрат	Пропиленгликоль, полисорбат 80, вода, убихинон, лецитин, феноксиэтанол	15,000	0,0750

Таблица 50

Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 крема 3% .

Ингредиенты фазы A были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Ингредиенты фазы B, за исключением дисперсии карбомера, были добавлены в соответствующий контейнер и смешаны. Ингредиенты фазы C были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Концентрат CoQ10 21% фазы E был добавлен в соответствующий контейнер и расплавлен при температуре между 50 и 60 °C с использованием водяной бани. Ингредиенты смешивались при необходимости для достижения однородности. Дисперсия карбомера была добавлена в соответствующий контейнер (емкость для смешивания) и нагрета до температуры между 70 и 80 °C во время смешивания. Продолжая смешивание, ингредиенты фазы B были добавлены к нагретой дисперсии карбомера в емкость для смешивания, температура при этом поддерживалась. Содержимое емкости постоянно перемешивалось и гомогенезировалось. Миксер затем был выключен, но гомогенизация продолжалась. Пока гомогенизация продолжалась, диоксид титана фазы D

добавлялся к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и ингредиенты смешивались и гомогенизировались до достижения полной однородности (проверка по цвету). Гомогенизатор затем был остановлен и партия была охлаждена при температуре между 50 и 60 °С. Миксер был затем выключен и расплавленный концентрат CoQ10 21% был добавлен к емкости для смешивания. Миксер был затем впоследствии включен и содержимое смешивалось/рециркулировало пока дисперсия не стала ровной и однородной. Содержимое емкости для смешивания затем было охлаждено при температуре между 45 и 50 °С. Охлажденное содержимое затем было перенесено в соответствующий контейнер для хранения перед упаковкой.

Пример 37: Способ приготовления 0,5 кг CoQ10 крема 3%, который включает CoQ10 21% концентрат и каприновый/каприлиновый триглицерид

0,5 кг партии CoQ10 крема 3,0% было приготовлено путем комбинации следующих фаз. Фаза А включала каприлилиновый/каприновый триглицерид 4,00% (по весу), цетиловый спирт 2,00% (по весу), глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,50% (по весу) и стеариловый спирт NF 1,5% (по весу). Проценты и количества перечислены в следующей таблице.

Фаза	**Торговое название**	**CTFA Название**	**Процент**	**Количество (кг)**
A	Caprylic	Каприновый триглицерид	4,000	0,0200
A	Rita CA	Цетиловый спирт	2,000	0,0100
A	Rita SA	Стеариловый спирт	1,500	0,0075
A	Ritapro 165	Глицерина стеарат и ПЭГ-100 стеарат	4,500	0,0225

Таблица 51

Фаза В включала диэтиленгликоля моноэфир NF 5,00% (по весу), глицерин USP 2,00% (по весу), пропиленгликоль USP 1,50% (по весу), феноксиэтанол NF 0,475% (по весу), очищенную воду USP 16,725% (по весу) и 2% дисперсию карбомера 40,00% (по весу). Проценты и количества перечислены в следующей таблице..

Фаза	Торговое название	CTFA Название	Процент	Количество (кг)
B	Rita глицерин	Глицерин	2,000	0,0100
B	Пропиленгликоль	Пропиленгликоль	1,500	0,0075
B	Transcutol P	Этоксидигликоль	5,000	0,0250
B	Феноксиэтанол	Феноксиэтанол	0,475	0,0024
B	Acritamer 940, 2% дисперсия	Вода, феноксиэтанол, пропилен гликоль, карбомер 940	40,000	0,2000
B	Очищенная вода, USP	ВОДА	16,725	0,0836

Таблица 52

Фазы C включала молочную кислоту USP 0,50% (по весу), раствор лактата натрия USP 2,00% (по весу), триэтаноламин NF 1,30% (по весу), и очищенную воду USP 2,50% (по весу). Проценты, количества и другие детали перечислены в следующей таблице.

Фаза	Торговое название	CTFA Название	Процент	Количество (кг)
C	Tealan 99%	Триэтаноламин	1,300	0,0065
C	Ritalac LA	Молочная кислота	0,500	0,0025
C	Ritalac NAL	Лактат натрия, вода	2,000	0,0100
C	Очищенная вода, USP	Вода	2,500	0,0125

Таблица 53

Фаза D включала диоксид титана USP 1,00% (по весу), а фаза E включала CoQ10 21% концентрат 15% (по весу). Проценты, количества и другие детали перечислены в следующих таблицах.

Фазы	Торговое название	CTFA Название	Процент	Количество (кг)
D	Диоксид титана, #3328	ДИОКСИД ТИТАНА	1,000	0,0050

E	CoQ10 21% концентрат	Пропиленгликоль, полисорбат 80, вода, убихинон, лецитин, феноксиэтанол	15,000	0,0750

Таблица 54

Все весовые проценты соответствовали весу полной композиции CoQ10 крема 3% .

Ингредиенты фазы A были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Ингредиенты фазы B, за исключением дисперсии карбомера, были добавлены в соответствующий контейнер и смешаны. Ингредиенты фазы C были добавлены в соответствующий контейнер и нагреты до температуры между 70 и 80 °C на водяной бане. Концентрат CoQ10 21% фазы E был добавлен в соответствующий контейнер и расплавлен при температуре между 50 и 60 °C с использованием водяной бани. Ингредиенты смешивались при необходимости для достижения однородности. Дисперсия карбомера была добавлена в соответствующий контейнер (емкость для смешивания) и нагрета до температуры между 70 и 80 °C во время смешивания. Продолжая смешивание, ингредиенты фазы B были добавлены к нагретой дисперсии карбомера в емкость для смешивания, температура при этом поддерживалась. Содержимое емкости постоянно перемешивалось и гомогенезировалось. Миксер затем был выключен, но гомогенизация продолжалась. Пока гомогенизация продолжалась, диоксид титана фазы D добавлялся к емкости для смешивания. Миксер был затем включен и ингредиенты смешивались и гомогенизировались до достижения полной однородности (проверка по цвету). Гомогенизатор затем был остановлен и партия была охлаждена при температуре между 50 и 60 °C. Миксер был затем выключен и расплавленный концентрат CoQ10 21% был добавлен к емкости для смешивания. Миксер был затем впоследствии включен и содержимое смешивалось/рециркулировало пока дисперсия не стала ровной и однородной. Содержимое емкости для смешивания затем было охлаждено при температуре между 45 и 50 °C. Охлажденное содержимое затем было перенесено в соответствующий контейнер для хранения перед упаковкой.

Пример 38: Способ приготовления 20 кг CoQ10 крема 3%, который включает CoQ10 21% концентрат и каприновый/каприлиновый триглицерид

20 кг партии CoQ10 крема 3,0% было приготовлено путем комбинации ингредиентов фаз A-E. следующих фаз. Весовые проценты, количества и другие детали ингредиентов каждой фазы перечислены в следующей таблице.

Фаза	RM Number	Название сырья	Теоретическое количество % по весу	г
A	RM-026	RM-026: Каприновый/каприлиновый триглицерид	4,000	800,0
A	RM-003	RM-003: Цетиловый спирт NF	2,000	400,0
A	RM-005	RM-005: Стерариловывй спирт NF	1,500	300,0
A	RM-016	RM-016: Глицерина стеарат /ПЭГ-100 Стеарат	4,500	900,0
B	RM-001	RM-001: Глицерин USP	2,000	400,0
B	RM-021	RM-021: Пропиленгликоль USP	1,500	300,0
B	RM-007	RM-007: Диэтиленгликоля моноэтиловый эфир NF	5,000	1000,0
B	RM-013	RM-013: Феноксиэтанол NF	0,475	95,0
B	IP-003	IP-003: Карбомера дисперсия, 2%	40,000	8000,0
B	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP	13,725	2745,0
B	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP (для промывки)	3,000	600,0

C	RM-009	RM-009: Троламин NF	1,300	260,0
C	RM-006	RM-006: Молочная кислота USP	0,500	100,0
C	RM-012	RM-012: Раствор лактата натрия USP, 60%	2,000	400,0
C	RM-011	RM-011: Очищенная вода USP	2,500	500,0
D	RM-008	RM-008: Диоксид титана USP	1,000	200,0
E	IP-004	IP-004: CoQ10 концентрат, 21%	15,000	3000,0
		Всего	**100,00**	**20000,0**
Для очистки РК-2 (Вакуумная емкость)				
	RM-019 or RM-020	Азот 97% NF или Азот NF	необх. кол-во	необх. кол-во

Таблица 55

Для приготовления 20 кг партии CoQ10 крема 3%, использовались следующие процедуры. Перед взвешиванием химических ингредиентов, с особой тщательностью убедились в том, что место работы и все оборудование чистое. Вначале химические ингредиенты были взвешены, особенно тщательно избегая разбрызгивания.

Вначале было взвешено 200 г диоксида титана USP (фаза D). Затем 600 г очищенной воды (помеченной “вода для промывки – фаза B”) было взвешено.

Для приготовления фазы A 800 г капринового/каприлинового триглицерида, 400 г цетилового спирта NF, 300 г стеарилового спирта NF, 900 г глицерина стеарата /ПЭГ-100 стеарата было взвешено. Эти предварительно взвешенные ингредиенты фазы A были добоавлены к 4 л SS стакану и помечены как фаза A. Следует отметить, что предсмесь следует использовать в течение 24 часов. Контейнер фазы A затем был закрыт и отставлен для позднейшего использования.

Для приготовления фазы B 8000 г 2,0% дисперсии карбомера, 400 г

глицерина USP, 300 г пропиленгликоля, 1000 г диэтиленгликоля моноэтилового эфира NF, 95 г феноксиэтанола NF и 2,745 г очищенной воды USP (помеченной "очищенная вода для фазы B") были взвешены. Эти предварительно взвешенные ингредиенты фазы B затем были добавлены в 10 л SS стакан. Следует отметить, что предсмесь следует использовать в течение 24 часов. Содержимое контейнера фазы B было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Контейнер фазы B затем был закрыт и отставлен для позднейшего использования.

Для приготовления фазы C 260 г триэтаноламина NF, 400 г раствора лактата натрия USP, 60% 500 г очищенной воды (помеченной "очищенная вода для фазы C") и 100 г молочной кислоты USP было взвешено. Эти ингредиенты фазы C были затем добавлены к 2 л SS стакану в следующем порядке: (1) 260 г троламина, (2) 400 г раствора лактата натрия, 60%, (3) 500 г очищенной воды для фазы C, и (4) 100 г молочной кислоты USP. Контейнер был помечен Фаза C. Следует отметить, что предсмесь следует использовать в течение 24 часов. Содержимое контейнера фазы C было вручную смешано лопаточкой до достижения прозрачности и однородности. Контейнер фазы C затем был закрыт и отставлен для позднейшего использования.

Для приготовления фазы E 3000 г CoQ10 21% концентрата было взвешено и помещено в контейнер, помеченный фаза E. Контейнер фазы C затем был закрыт и отставлен для позднейшего использования.

Для составления смеси CoQ10 крема 3%, 2 водяные бани были использованы для нагрева фаз A, C и E. Во-первых, фазы A стакан был помещен на водяную баню при 70-75 °C и содержимое смешивалось вручную лопаточкой до достижния прозрачности и однородности. Стакан фазы C был помещен на водяную баню при 60-65 °C. Содержимое стакана фазы C смешивалось вручную лопаточкой до достижния прозрачности и однородности. Стакан фазы E был помещен на водяную баню при температуре 50-55 °C. Содержимое стакана фазы E смешивалось вручную лопаточкой до достижния прозрачности и однородности.

Для составления крема были использованы водяная баня (E-1), закрытая вакуумная емкость (PK-2), Waukesha насос (P-1) и гомогенизатор Сильверсона.

Вначале убедились, что нижний вентиль PK-2 закрыт и что PK-2 закрыт. Смотровое стекло затем было вынуто из PK-2 и предварительно взвешенные

10000 г 2,0% дисперсии карбомера были добавлены в РК-2 емкость через отверстие смотрового стекла. Для удаления дисперсии карбомера 2%, который налип на лопасти мешалки во время добавления, использовалась лопаточка. TIC-2 (регистратор температуры) для РК-2 затем был включен и убедились, что регистратор работает правильно.

Смеситель (А-2) для РК-2 был включен и 2,0% дисперсия карбомера нагревалась с паровой рубашкой до 70-80 °С. Смотровое стекла затем было вынуто из РК-2 и фаза В медленно добавлялась из SS стакана в РК-2, через отверстие смотрового стекла. Контейнер фазы В затем был промыт "водой для промывки фазы В." Эта промывка затем была добавлена к РК-2 через отверстие смотрового стекла.

Фаза А затем была медленно добавлена к РК-2. Лопаточка использовалась для переноса фазы А, оставшейся на стенках SS стакана. Следует заметить, что температура фазы А должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2.

Вначале убедились, что нижний вентиль РК-2 закрыт и что РК-2 должным образом закрыт. Смотровое стекло было затем убрано. Предварительно взвешенные 10000 г 2,0% дисперсии карбомера были затем добавлены в РК-2 через отверстие в смотровом стекле. Лопаточка использовалась для переноса 2,0% дисперсии карбомера со стенок контейнера. The TIC-2 (указатель температуры) для РК-2 был затем включен для гарантии правильности операции. Смеситель для РК-2 (А-2) затем был включен и 2,0% дисперсия карбомера в РК-2 нагревалась с паровой рубашкой до 70-80 °С. Вакуум был выключен. Смотровое стекло затем было вынуто из РК-2 и фаза В, из SS стакана, была медленно добавлена в РК-2 через отверстие смотрового стекла. Контейнер фазы В затем был промыт "водой для промывки фазы В." Промывочная вода была добавлена в РК-2 через отверстие смотрового стекла. Фаза А была затем медленно добавлена к РК-2. Лопаточка использовалась для переноса фазы А со стенок контейнера в SS стакан. Надо заметить, что температура фазы А должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2. Нижний вентиль РК-2 затем был открыт. Р-1 (насос Waukesha) и Р-2 (гомогенизатор Сильверсона) были включены и содержимое РК-2 (вакуумная емкость) были гомогенизированы. Фаза С была медленно добавлена в РК-2 через отверстие для доступа. Надо заметить, что температура должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2. Затем удостоверились, что гомогенизатор работал

более 5 минут, прежде чем А-2 (смеситель) был выключен. Предварительно взвешенные 200,0 г диоксида титана фазы фазы затем были медленно засыпаны через 100 ячеечное сито в РК-2. Лопаточка использовалась для того чтобы убрать весь диоксид титана, который налип на лопасти РК-2.

Нижний вентиль РК-2 затем был открыт и Р-1 насос и Р-2 (гомогенизатор Сильверсона) были включены. Содержимое РК-2 было гомогенизировано.

Фаза С была медленно добавлена в РК-2 через отверстие для доступа. Надо заметить, что температура должна быть между 70-80 °С при добавлении к РК-2. Затем удостоверились, что гомогенизатор работал более 5 минут, прежде чем смеситель А-2 был выключен. Предварительно взвешенные 200 г диоксида титана USP затем были медленно засыпаны через 100 ячеечное сито в РК-2. Лопаточка использовалась для того чтобы убрать весь диоксид титана, который налип на лопасти РК-2.

Смотровое стекло затем было вынуто и А-2 включен. Содержимое продолжало перемешиваться во время рециркулирования через Р-1 и Р-2. Гомогенизация продолжалась 10 минут или до достижения полной однородности (проверка цвета). Р-2 был остановлен через 10 минут. Содержимое РК-2 было охлаждено до 50-60 °С. Смотровое стекло было вынуто и расплавленный CoQ10 21% концентрат фазы Е был медленно добавлен к РК-2. Смотровое стекло затем было помещено обратно.

Содержимое РК-2 было смешано с А-2 до достижения однородности. Температура поддерживалась на уровне 50-60 °С и содержимое рециркулировало сквозь Р-1. Был начат поток азота NF и затем С-2 (вакуумный насос) был включен. Следует заметить, что лучше избежать образования пены продукта. Партия затем была охлаждена до 45-50 °С и вакуум и азот NF были включены. Когда продукт охладили до нужной температуры, С-2 (вакуумный насос) был выключен и вакуум и азот NF ослабились. Поток азота NF закончился. Выпускной вентиль затем был очищен от продукта перед тем как собрать пробы или упаковать продукт.

Продукт был перенесен в предварительно взвешенные, чистые, ПЭНД закрытые контейнеры. Насос А-2, Р-1 Waukesha и поток азота NF были выключены и партия была закончена и помечена как TIC-2.

Было взято две 30 г (минимум) проб для микротеста и два образца по 400 г (минимум) для физического/химического анализа. Одна серия образцов была

помечена как «взято». Наполненные контейнеры были взвешены. Размер партии составлял 20000 г.

Пример 39: Способ лечения SCCIS местным применением CoQ10 крема 3%

Композиция CoQ10 крема 3,0%, как описано выше (*напр.*, примеры 15 и 16), была местно применена к *in situ* кожным плоскоклеточным карциномам (SCCIS). Тридцать пять (35) субъектов подверглись местному лечению медикаментом на основе 3,0% CoQ10 вода-в-масле эмульсионного крема. Медикамент был упакован и хранился при комнатной температуре в защищенных от света контейнерах.

Анализы выборки были определены как (1) выбранная для лечения (ITT) выборка, (2) безопасная выборка и (3) протокольная (PP) выборка. The ITT выборка включала всех субъектов, которые были выбраны для исследования лекарства (CoQ10 3%). Безопасная выборка включала всех субъектов, которые получили, по меньшей мере, одну дозу изучаемого продукта. PP выборка включала всех субъектов, у которых была SCCIS, подтвержденная гистологическими данными, которые на шестой неделе подверглись гистологическому исследованию и не пропустили ни одного визита.

Субъекты были в других в других отношениях взрослыми мужчинами и женщинами, по меньшей мере, с одним подтвержденным повреждением SCCIS, не находившемся на лице. Повреждения SCCIS, подходившие для экстирпации, имели минимальную площадь 0,5 $см^2$ и максимальный диаметр 2,0 см. и находились на таком месте, которое можно было защитить от солнечных лучей во время исследования. Примерно в одно и то же время каждое утро пациент промывал область повреждения, а затем наносил небольшое количество с горошину (50-100 мг) местного медикамента в виде крема на кусок вощеной бумаги или аппликатор. Пациент затем накладывал подходящее количество крема на повреждение и окружающую область с использованием ватного тампона или аппликаторной палочки. Обработанный участок не мылся, по меньшей мере, 8 часов после аппликации. Приблизительно в одно и то же время каждый вечер процедура повторялась. Повреждение и окружающая область защищались от солнечных лучей под одеждой.

В первый день лечения измерялся диаметр и подсчитывалась область повреждения. Повреждения также фотографировались. На 1, 2, 3, 4 и 5 неделях субъекты оценивались и делались записи их основных показателей: давление крови, скорость пульса, скорость дыхания, оральная температура. Следующие клинические признаки/симптомы раздражения кожи на основании следующих таблиц также градировались для оценки безопасности лечения CoQ10 3%: эритема, шелушение, сухость, зуд, жжение.

Эритема

0	Эритема не наблюдается
1	Легкое покраснение, ограниченное маленьким участком
2	Среднее покраснение на большей части обработанного участка
3	Заметное покраснение на большей части обработанного участка
4	Сильное покраснение, наличие отека, возможные изъявления

Таблица 56

Шелушение

0	Шелушение не наблюдается
1	Слабое отслаивание или отдельные небольшие чешуйки могут наблюдаться на отдельных участках
2	Среднее отслаивание/шелушение. Легко заметные трещины. Края чешуек покрывают большую часть обработанного участка
3	Заметное шелушение, трещины, отслаивание и падающие чешуйки на большей части обработанного участка
4	Присутствуют большие куски отслаивающегося эпидермиса

Таблица 57

Сухость

0	Жирный блеск на большей части обработанного участка
1	Нормальное, нет сухости, нет заметного блеска
2	Легкая сухость, проявляющаяся на маленькой части обработанного участка
3	Средняя сухость, проявляющаяся на большей части обработанного участка
4	Сильная сухость, трещины по всему обработанному участку

Таблица 58

Зуд

0	Нет зуда
1	Временами слабый зуд, не влияющий на повседневную активность
2	Слабый зуд, присутствующий большую часть времени, не влияющий на повседневную активность или сон
3	Средний зуд, временами мешающий повседневной активности или сну
4	Интенсивный зуд, мешающий повседневной активности или сну

Таблица 59

Жжение

0	Нет жжения
1	Временами слабое жжение, не влияющее на повседневную активность
2	Слабое жжение, присутствующее большую часть времени, не влияющее на повседневную активность или сон
3	Среднее жжение, временами мешающее повседневной активности или сну
4	Интенсивное жжение, мешающее повседневной активности или сну

Таблица 60

Оценка безопасности по эритеме: В начале исследования 32 пациента (91,4%) имели определенную степень эритемы. Эти признаки у большинства пациентов были от слабого до среднего (28 пациентов, 80%) и 4 пациента (11,4%) имели заметное (степерь 3) покраснение. На 6 неделе эритема отсутствовала у 4

пациентов (11,8%) и была слабой или средней у 30 пациентов (88,2%), тогда как эритема степени 3 не наблюдалась. Максимальная степень эритемы, наблюдавшаяся во время исследования, стала слабее по сравнению с началом исследования у 7 пациентов, не изменилась у 15 пациентов и стала сильнее у 13 пациентов. Конечная степень эритемы уменьшилась по сравнению с началом исследования у 11 пациентов, не изменилась у 22 пациентов и ухудшилась у 2 пациентов.

Оценка безопасности по шелушению: В начале исследования 27 пациентов (77,1%) имели определенную степень шелушения и 8 пациентов (22,9%) не имели. На 6 неделе видимое шелушение отсутствовало у 16 пациентов (47,1%), было легким у 17 пациентов (50%), и было средним только у одного 1 пациента (2,9%). Максимальная степень шелушения, наблюдавшаяся во время исследования, стала слабее по сравнению с началом исследования у 7 пациентов, не изменилась у 20 пациентов и стала сильнее у 8 пациентов. Конечная степень эритемы уменьшилась по сравнению с началом исследования у 16 пациентов, не изменилась у 24 пациентов и ухудшилась у 5 пациентов.

Оценка безопасности по сухости: У восьми пациентов (22,9%) имелась легкая или средняя сухость в начале исследования, а 77,1% не имели сухости (степень 1) или жирный блеск (степень 0) на обрабатываемом участке. На 6 неделе у всех пациентов , кроме 1, степень сухости была 0 или 1 (97,1%). Максимальная степень сухости, наблюдавшаяся во время исследования, стала слабее по сравнению с началом исследования у 7 пациентов, не изменилась у 23 пациентов и стала сильнее у 5 пациентов. Конечная степень сухости уменьшилась по сравнению с началом исследования у 13 пациентов, не изменилась у 21 пациента и ухудшилась у 1 пациента.

Оценка безопасности по зуду: Большинство пациентов в начале исследования сообщали об отсутствии (74,3%) или о слабом, случайном (20%) зуде, а 2 субъекта (5,7%) сообщили о зуде степени 2 или 3. На 6 неделе зуд стал слабее настолько, что 94,1% не было зуда и только 2 пациента (5,9%) имели слабый, случайный зуд. С недели 1 до недели 6 ни у одного пациента зуд не превышал степень 1 (слабый, случайный зуд). Максимальная степень сухости, наблюдавшаяся во время исследования, стала слабее по сравнению с началом исследования у 5 пациентов, не изменилась у 24 пациентов, и стала сильнее у 6

пациентов. Конечная степень зуда уменьшилась по сравнению с началом исследования у 9 пациентов, не изменилась у 24 пациентов, и ухудшилась у 2 пациентов.

Оценка безопасности по жжению: В начале исследования жжение отсутствовало у большинства пациентов (94,3%) и было слабым у 2 пациентов (5,7%). Эти значения оставались практически неизменными в ходе исследования. Ни у одного пациента значение не превышало степень 1 (слабую) и только у двух пациентов значение имело степень 1 на каком-либо визите с Дня 1 (начало исследования) до конца недели 6. Максимальная степень жжения, наблюдавшаяся во время исследования, стала слабее по сравнению с началом исследования у 2 пациентов, не изменилась от "нет жжения" у 28 субъектов, и ухудшилась (от нет до слабой) у 5 субъектов. Конечная степень жжения уменьшилась по сравнению с началом исследования у 2 пациентов, не изменилась у 31 пациента и ухудшилась у 2 пациентов.

Также измерялись диаметры повреждений и определялись размеры участка для оценки эффективности воздействия CoQ10 3%. В конце 6 недели периода лечения был назначен последний визит, где были сделаны измерения основных показателей и установлены клинические признаки/симптомы. Физическое исследование также было осуществлено на 6 неделе в последний визит. На последнем визите были также взяты образцы крови на голодный желудок в течение 3 часов после последней аппликации крема для определения концентрации CoQ10 в плазме. Повреждения были сфотографированы, измерены диаметры и определены размеры участка.

Результаты местного лечения SCCIS CoQ10 кремом 3% показали эффективность, как изображено на фотографиях до и после лечения на фигурах 4-9. Первичным критерием оценки эффективности был процент пациентов с полной реакцией, определенной как негативная гистологическая оценка целевого повреждения на неделе 6. Вторичным критерием оценки эффективности был процент пациентов с частичным ответом, определявшимся как, по меньшей мере, 50% уменьшение области (определявшейся по двум главным диаметрам) обработанного повреждения на неделе 6. Результаты показали, что 23,5% ITT выборки имели полный ответ на неделе 6, а 18,5% PP выборки имели полный ответ на неделе 6.

Вторичные результаты оценки эффективности показали, что ITT выборка имела 26,5% частичного 50% ответа и 2,9% имела 75% частичного ответа на неделе 6. Частичный ответ наблюдался уже на неделе 1 у 2 пациентов и неделе 2 у 8 пациентов. Самая высокая степень частичного ответа наблюдалась на неделях 4 и 5. Интересно, что у 8 пациентов с полным ответом на неделе 6, 4 пациента не имели частичного ответа, основанного на визуальной инспекции, и ни у кого не было 75% ответа. В PP выборке 22,2% имели 50% частичный ответ, тогда как 0% имели 75% частичный ответ. Среднее изменение и средний процент изменения повреждения были -0,3 $см^2$ и -26,1% соответственно, в ITT выборке на неделе 6 и -0,3 $см^2$ и -23,4% соответственно в PP выборке.

В целом, CoQ10 3% крем был безопасным и хорошо переносимым. Полное излечение было достигнуто у примерно 25% пациентов ITT выборки.

Пример 40: Способ лечения BCC местным применением CoQ10 крема 3%

Базальноклеточная карцинома (BCC) – наиболее распространенная форма кожных злокачественных заболеваний, и наиболее распространенная форма рака в Соединенных Штатах. По оценке Американского Общества Рака каждый год диагностируется около 800000 новых случаев базальноклеточной карциномы. Поверхностная базальноклеточная карцинома (sBCC) редко метастазирует и обычно излечима хирургическим вмешательством или местными агентами.

Композиция CoQ10 крема 3,0%, как описано выше в примерах 35-36, была местно применена к ста шестидесяти (160) здоровых в других отношениях взрослым мужчинам или женщинам с одним или более гистологически подтвержденными повреждениями, вызванными базальноклеточной карциномой (sBCC). Для лечения выбиралось одно подтверждение с минимальной площадью 0,5 $см^2$ и максимальным диаметром 2,0 см. sBCC повреждение не находилось на лице и его можно было защитить от солнечных лучей во время исследования.

Это исследование было рандомизированным, слепым двойным плацебо-контролируемым параллельным исследованием. Каждый субъект был случайным образом распределен в одну из четырех (4) групп: 1,5% CoQ10 крем qd (один раз в день) плюс крем-носитель qd (один раз в день), 3,0% CoQ10 крем qd (один раз в

день) плюс крем-носитель qd (один раз в день), 3,0% CoQ10 крем bid (дважды в день), или крем-носитель bid (дважды в день). В каждой группе было 40 пациентов.

	AM	PM
1.	3% CoQ10	3% CoQ10
2.	Носитель B	3% CoQ10
3.	Носитель A*	1,5% CoQ10
4.	Носитель A	Носитель A

Таблица 61

На первом скрининговом визите измерялись диаметры повреждений и определялся размер участка. Участки определялись оценкой двух наибольших перпендикулярных диаметров и умножением для получения результата в $см^2$. Основные показатели субъектов измерялись и записывались и было проведено физическое обследование. Брались образцы крови на голодный желудок и был проведен полный анализ крови (CBC), а также клинический биохимический анализ на липиды. Образцы крови собирались для определения базовых концентраций CoQ10 в плазме, образцы брались дважды и хранились. Также делались анализы мочи и для женщин с возможной беременностью делался тест на беременность по моче. Пациенты затем классифицировались по следующим клиническим признакам/симптомам раздражения кожи: эритема, шелушение, сухость, зуд, жжение.

На первый день исследования (день 1), основные показатели пациентов снова были записаны и клинические признаки/симптомы раздражения кожи были классифицированы как на скрининговом визите. Пациентов также опросили о нежелательных явлениях, параллельном использовании местных продуктов и параллельном использовании медицинских препаратов. Целевые sBCC повреждения были затем сфотографированы и оценены по диаметру и размеру участка, как на скрининговом визите. Пациентам затем дали медицинский набор, содержащий CoQ10 медицинский препарат. CoQ10 крем применялся пациентом

дважды в день в течение шести недель к sBCC повреждению и 1 см близлежащей кожи.

Режим дозирования включал в себя промывание поврежденного участка примерно в одно и то же время каждое утро, распределение небольшого количества с горошину (50-100 мг) крема на кусок вощеной бумаги или аппликатор. Субъект затем накладывал подходящее количество крема на повреждение и окружающую область с использованием ватного тампона или аппликаторной палочки. Обработанный участок не мылся, по меньшей мере, 8 часов после аппликации. Приблизительно в одно и то же время каждый вечер процедура повторялась. Повреждение и окружающая область защищались от солнечных лучей под одеждой.

Были промежуточные визиты пациентов, которые происходили на неделях 1, 2, 3, 4, и 5. На каждом из этих визитов основные показатели записывались, как на первом визите, и клинические признаки/симптомы классифицировались. Диаметр повреждения оценивался и определялся размер участка. Пациентов затем опрашивали о нежелательных явлениях, параллельном использовании местных продуктов и параллельном использовании медицинских препаратов. Клиническая оценка проводилась еженедельно.

В конце периода лечения основные показатели были записаны как на первоначальном визите и клинические признаки/симптомы были градированы. Диаметр повреждения оценивался и определялся размер участка. Также проводилось физическое обследование. Брались образцы крови не более чем через 3 часа после последнего применения крема для определения концентраций CoQ10 в плазме. Был проведен полный анализ крови (CBC) и клинический биохимический анализ на липиды.

На четвертой неделе после лечения (неделя 10 исследования), пациент возвращался для заключительной оценки и экстирпации участка повреждения sBCC. Основные показатели были взяты и записаны и клинические признаки/симптомы, как на первоначальном скрининговом визите, были классифицированы.

Результаты лечения показали, после обзора патологии 110 пациентов, что, по меньшей мере, 20% пациентов, которые получали местное лечение CoQ10 кремом 3%, демонстрировали уменьшение симптомов, как было определено по

понятным специалистам критериям эффективности. В частности, 24 из 110 пациентовне было признаков sBCC на основе биопсии поврежденного участка на 8 неделях.

Пример 41: Фармакокинетические результаты местного воздействия CoQ10

Семьдесят две BALB/c мыши были рандомально разделены на девять групп по восемь мышей в каждой (Группы I-IX). Группа I воздействию не подвергалась. В день 0 группы II-VIII были местно обработаны 0,1 г тестируемой композиции (крем масло-в-воде, эмульсия, содержащая 3% по весу CoQ10, крем с добавлением C-14 радиометки API 31510) в дозе 5 мг/см^2. Радиоактивный API 31510 был добавлен в партию 3% крема, чтобы обогатить экспериментальную формулу крема специфической активностью приблизительно 50 мкКи/г продукта или 5 мкКи/дозу введения. Тестируемая композиция местно наносилась на кожу на спине каждой мыши в Группах II-IX стеклянной палочкой. Сразу же после получения дозировки животные группы II были забиты и кровь, моча, фекалии и целевые органы (печень, поджелудочная железа и селезенка) были извлечены и взвешены. Из крови была получена сыворотка и каждый орган был гомогенизирован. Группы III-VIII были забиты на 2, 4, 8, 12, 18 и 24 часах после получения дозировки, соответственно, и у них были взяты те же пробы. Группа IX местно обрабатывалась 0,1 г тестируемой композиции в течение семи дней (Дни 0-6). На день 7, через 24 часа после последнего применения тестируемой композиции на День 6, группы I и IX были забиты и у них были взяты те же пробы, что и у предыдущих групп. У каждого образца определялось число распадов в минуту (DPM) и значение DPM/тип образца считалось для каждой группы.

Оценка основывалась на подсчете уровней радиоактивности в сыворотке, моче, фекалиях и целевых органах (печени, поджелудочной железе и селезенке) на различных временных точках с целью определить уровни подкожного проникновения тестируемого вещества на 24 часах и определить, где лекарство аккумулируется в соответствии со способом применения.

Сводная таблица среднего веса образцов в граммах для каждой группы

представлена ниже.

	Поджелудочная железа	Печень	Селезенка	Фекалии	Моча	Кровь
Группа I	0,2907	1,4468	0,0776	0,0654	Не определяется	0,43 IS
Группа II	0,1691	1,3352	0,0935	0,0164	Не определяется	0,4530
Группа III	0,1300	1,0688	0,1777	0,0324	0,0890	0,4429
Группа IV	0,1377	0,9893	0,0846	0,0292	0,0802	0,3770
Группа V	0,1780	0,7105	0,0760	0,0299	0,0864	0,3222
Группа VI	0,1156	0,8994	0,0595	0,0328	Не определяется	0,3273
Группа VII	0,2864	1,1312	0,3355	0,0160	0,0671	0,2077
Группа ЛТП	0,1969	1,1929	0,0905	0,0350	0,0097	0,3093
Группа IX	0,3068	1,2912	0,0839	0,1034	Не определяется	0,3439
Среднее	**0,2012**	**1,1184**	**0,1199**	**0,041**	0,0665	0,3572

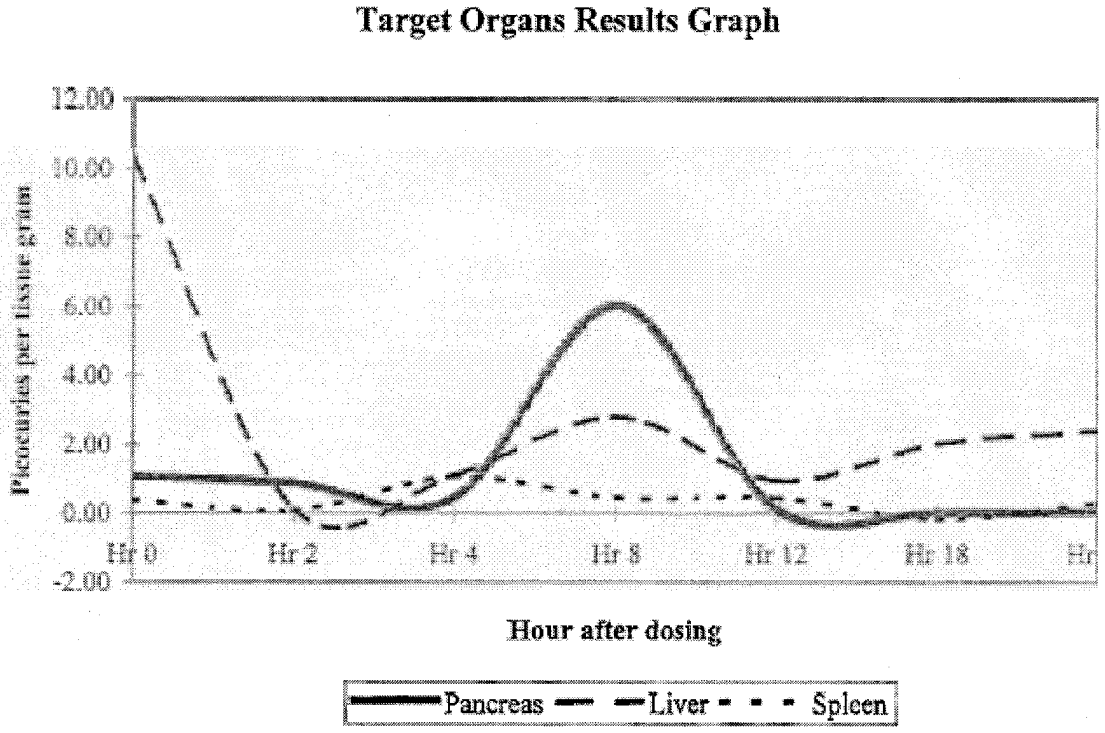
Таблица 62

Распады в минуту (DPM) представлены в таблице 63 и подсчитаны на сцинтилляционном счетчике для каждого типа образца ткани из каждого животного. Средний DPM для кажого типа образца был подсчитан. После того как результаты были приведены к количеству 1 мл, среднее было затем разделено на средний вес органа для того чтобы получить DPM на грамм ткани. Контрольные (группа I) результаты были затем вычтены из результатов каждой группы для удаления фоновой радиации и получения актуального числа среднего DPM на грамм ткани для каждого образца в группе. При делении на константу 2220000, результаты были преобразованы в микрокюри на грамм ткани. Конечные результаты представлют пикокюри (микрокюри x 1000) на грамм ткани. Результаты для органов представлены в таблицах и графиках ниже.

Таблица 63

РЕЗУЛЬТАТЫ ПО ЦЕЛЕВЫМ ОРГАНАМ
Пикокюри на грамм ткани

	Поджелудочная железа	Печень	Селезенка
Час 0 - Группа II	1,09	10,34	0,40
Час 2 - Группа III	0,87	0,14	0,09
Час 4 - Группа IV	0,47	1,11	1,07
Час 8 - Группа V	6,05	2,80	0,45
Час 12 - Группа VI	0,13	0,96	0,46
Час 18 - Группа VII	0,03	2,02	-0,15
Час 24 - Группа	0,07	2,40	0,030



Данные отражают, что тестируемая композиция аккумулировалась преимущественно в поджелудочной железе на приблизительно восьми (8) часах после дозировки и также, в меньшем количестве, в печени на восьми часах после дозировки. Количество пикокюри на грамм ткани в селезенке и поджелудочной железе уменьшился почти до нуля к 18 часам после дозировки. На часе 0 в печени результаты были аномальными из-за одного животного с исключительно высоким количеством DPM на нуле часов после дозировки. Одно возможное объяснение этого аномально высокого результата состоит в том, что животное сумело

употребить тестируемое вещество внутрь, или слизав его с кожи, или слизав его с лап после того как потерло место дозы. Это возможно могло доставить тестируемое вещество в печень намного быстрее, чем подкожная абсорбция. После 8 часового пика в печени вещество слабо падает на 12 часах, но к 18 часам слабо возрастает и остается таким же на 24 часах.

График результатов по целевым органам (продолж.)

Количество тестируемых веществ, накопленных в каждом целевом органе выведен не для всех животных в группах II-VIII, процент пикокюри на грамм ткани выведен в таблице ниже

	Поджелудочная железа	**Печень**	**Селезенка**
Час 0	12,51%	52,30%	15,21%
Час 2	9,99%	0,71%	3,42%
Час 4	5,40%	5,61%	40,68%
Час 8	69,46%	14,16%	17,49%
Час 12	1,49%	4,86%	17,49%
Час 18	0,34%	10,22%	-5,70%
Час 24	0,80%	12,14%	11,41%

Таблица 65

Группы II-VIII получили дозу 4,112 микрокюри тестируемого вещества. Таблица внизу представляет количества микрокюри на каждый целевой орган в каждый временной период.

	Поджелудочная железа	**Печень**	**Селезенка**
Группа II - 0 часов	0,0011	0,0103	0,0004
Группа III - 2 часа	0,0009	0,0001	0,0001
Группа IV - 4 часа	0,0005	0,0011	0,0011
Группа V - 8 часов	0,0060	0,0028	0,0005

Группа VI -12 часов	0,0001	0,0010	0,0005
Группа VII - 18 часов	0,0000	0,0020	-0,0002
Группа VIII - 24 часа	0,0001	0,0024	0,0003

Таблица 66

После деления этих чисел на 4112 (количество микрокюри в каждой дозе), получаются проценты, которые представляют количество тестируемого вещества в каждом органе на каждый период времени. Таблица внизу представляет эти проценты.

	Поджелудочная железа	**Печень**	**Селезенка**
Час 0	0,03%	0,25%	0,01%
Час 2	0,02%	0,00%	0,00%
Час 4		0,03%	0,03%
Час **8**	0,15%	0,07%	0,01%
Час 2	0,00%	0,02%	0,01%
Час 18	0,00%	0,05%	0,00%
Час 24	0,00%	0.06%	0,01%

Таблица 67

Средний процент тестируемой композиции в микрокюри, попавших в целевой орган, составлял 0,03%, 0,07% и 0,01% в поджелудочной железе, печени и селезенке, соответственно.

Для проб телесных выделений конечные результаты были представлены в пикокюри на мл. Это количество наблюдалось при преобразовании DPM до 1 мл, вычитании результатов группы I, и последующего деления на постоянную 2220000 для наблюдения микрокюри на мл. Умножением этого результата на 1000, были получены пикокюри на мл. Средние пикокюри на мл для фекалий и мочи представлены на таблице и графике ниже.

	1 мл фекалий	1 мл мочи
Час 0 - Группа П	-0,0413	0,0002
Час 2-Группа Ш	18,2417	0,0000

Час 4 -Группа W	3,9348	0,0305
Час 8 - Группа V	117,1009	0,0081
Час. 12-Группа VI	52,7089	-0,0015
Час I8 - Группа	0,7791	0,0057
Час 24-Группа	0,1303	0,0016

Таблица 68

График результатов по образцам выделений

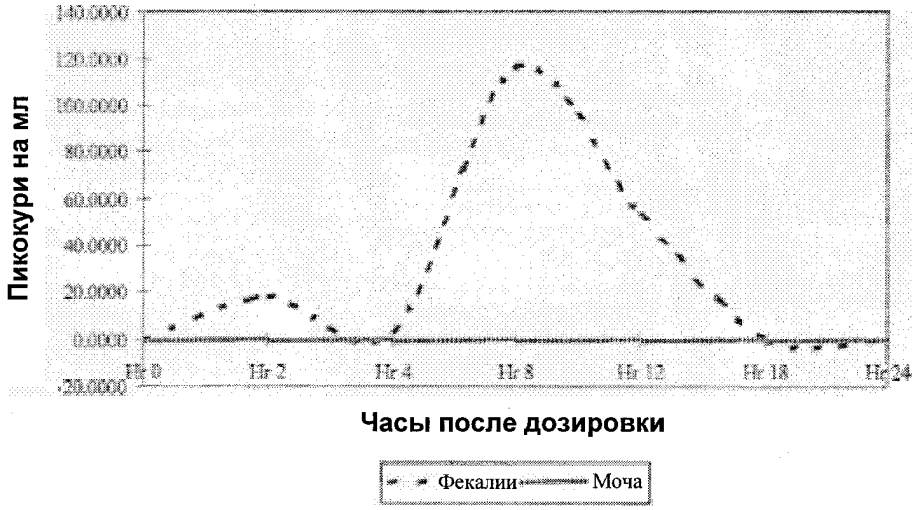


Таблица 69

Данные отражают, что тестируемая композиция аккумулировалась преимущественно в фекалиях через восемь часов после дозировки, продолжал присутствовать на 12 часах после дозировки, но был значительно ниже на 18 часах после дозировки. Нет признаков того, что тестируемая композиция аккумулировалась в моче на какой-либо точке во время исследования.

Результаты по крови были подсчитаны таким же образом, как результаты по телесным выделениям. Подсчеты для пикокюри на мл в крови дали отрицательные числа из-за высокого значения DPM в группе I – контрольной группе. Это было результатом того, что два животных имели более высокие значения DPM в крови, чем ожидалось. Результаты для крови представлены в таблице и графике ниже.

	1 мл крови

Час 0 - Группа I	-0,3706
Час 2 - Группа II	-0,3896
Час 4 - Группа III	-0,2877
Час 8 – Группа IV	-0.0890
Час 12 – ГруппаV	-0,1965
Час 18 - Группа VI	0,2164
Час 24 - Группа VII	-0,9545

Таблица 70

График результатов по крови

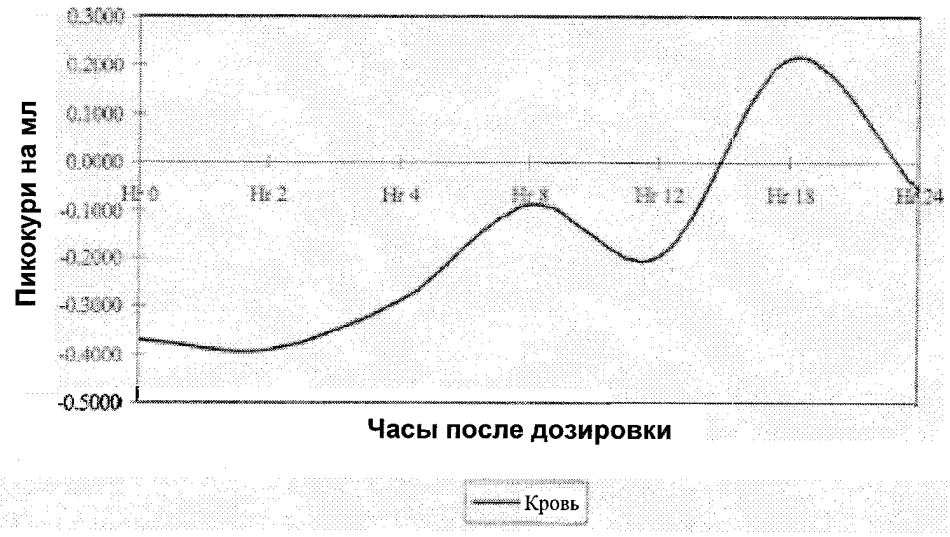


Таблица 71

Данные показывают, что тестируемое вещество не аккумулируется в крови; за исключением того, что тестируемое вещество может присутствовать в крови на 18 часах после дозировки. Странно, что не было найдено значительных количеств тестируемого вещества в крови, особенно поскольку тестируемая композиция наблюдалась в печени и поджелудочной железе. Одно объяснение заключается в подкожной абсорбции тестируемой композиции через кожу прямо в органы; однако, вряд ли тестируемая композиция не попадает в кровь после проникновения через кожу. Другая возможность заключается в том, что кровь немедленно распознает чужеродную субстанцию и депозитирует тестируемый материал в печень. Последняя дозировка для группы II была в 10:23 am и первое животное из группы II было забито в 10:45 am. Двадцать две минуты могли быть достаточным временем для того чтобы кровь освободилась от чужеродного материала.

Данные по группе IX считались отдельно, поскольку животные группы IX получали дозу неоднократно, а не один раз, и у них было 7 дней для абсорбции тестируемой композиции. Данные группы IX представлены на схемах ниже.

Пикокюри на грамм ткани из образцов органов			
	Поджелудочная железа	Печень	Селезенка
Группа IX	0,12	2,01	1,19

Таблица 72

Средние пикокюри на грамм ткани для групп II-VIII составляли 1,24, 2,83 и 0,38 для поджелудочной железы, печени и селезенки соответственно. Результаты группы IX для органов были ниже чем среднее для поджелудочной железы, близкими к среднему для печени и выше, чем среднее для селезенки. Данные показывают, что существуют возрастающие количества тестируемой композиции в селезенке на день 7 и что количества тестируемой композиции в печени на день 7 были сравнимы с теми же количествами, обнаруженными в печени на 18 и 24 часы после дозировки.

Пикокюри на мл из образцов выделений		
	Фекалии	Моча
Группа IX	25,0650	-0,0011

Таблица 73

Средние пикокюри на мл для фекалий для групп II – VIII было 27,55 и для мочи было 0,0064. Результаты фекалий группы IX и мочи не были аномальными и показывали лишь минимальные признаки наличия тестируемого вещества в фекалиях.

Пикокюри на мл из образцов крови	
	Кровь
Группа IX	-0,0538

Таблица 74

Как и с другими группами, результаты крови группы IX показывают, что тестируемое вещество не накапливается в крови.

Общие результаты показывают, что нет достоверной разницы по весу целевых органов, фекалий, мочи или крови между группами. В моче значительных количеств тестируемого вещества не было обнаружено. Не было мочи, собранной у групп I (контроль), II (час 0) или VI (час 12). За исключением группы VII (18 часов после дозировки), тестируемое вещество не определялось в значительном количестве в крови в любое время в течение исследования. Самые высокие количества пикокюри на грамм ткани и пикокюри на мл были отмечены у группы V (8 часов после дозировки) и наибольшая концентрация на этом времени была обнаружена в фекалиях и поджелудочной железе. Также в группе V, возросшие уровни пикокюри на грамм ткани были найдены в печени. В печени после слабого провала на 12 часу уровни оставались достаточно высокими на 18 часу и 24 часу и сравнимые уровни были найдены в печени группы IX (животные день 7). После пика на 8 часах после дозировки, количества в поджелудочной железе снизились почти до нулевых уровней, включая результаты группы IX. Количества в селезенке возрастали на 4 часе и затем уменьшались почти до нулевых уровней к 18 часу. Однако эти количества возрастали для группы IX, показывая аккумулируемое тестируемое вещество в селезенке на День 7. Наблюдалась подкожная абсорбция тестируемого вещества или метаболитов тестируемого вещества, поскольку соединение было найдено в печени и поджелудочной железе. Странно, что тестируемое вещество не присутствовало в крови в значительных количествах, поскольку ожидаемым путем транспорта должен был быть кровоток. Возможным объяснением могло быть быстрое очищение тестируемого вещества из крови печенью и поджелудочной железой. Другая возможность состоит в том, что тестируемое вещество заглатывалось животным, или путем слизвания самой дозы, или путем лизания лап, которыми они терли место, куда была нанесена доза.

ПРИМЕР 42: Анализ иммуноблоттингом клеток, обработанных коэнзимом Q10

За последние пять десятилетий был накоплен громадный объем информации касательно эндогенных/экзогенных факторов, влияющих на

специфические процессы, лежащие в основе злокачественной трансформации. Клиническая и базовая литература дает доказательства того, что изменения в структуре и функциях ДНК играют важную роль в инициации и развитии рака, определяя рак как генетическую болезнь. (Wooster, 2010; Haiman, 2010). В начале 1920-х Otto Warburg и другие исследователи, занимавшиеся характеристикой фундаментальных изменений в этиологии онкогенеза, описали два главных наблюдения (a) способность клеток транспортировать и утилизировать глюкозу при образовании АТФ в для образоваия энергии в присутствии кислорода – также известного как эффект Варбурга и (b) изменения в структуре и функции митохондрий – включая изменения в транспорте электронов, приводящие к уменьшению образования митохондриальной АТФ. Последние несколько лет в исследованиях возвращается представление о центральной роли клеточной биоэнергетики в этиологии рака, т.е. на взгляде на рак как на метаболическое заболевание.

Хотя историческимутации в генах считаются отвечающими за изменения в генной экспрессии, накопились литературные данные в поддержку того, что эпигенетические процессы играют ключевую роль во влиянии на экспрессию генов в поддержании канцерогенеза. Это доказывается наблюдениями, что скорость мутаций большинства генов низкая и не может быть причиной множества мутаций, находимых в раковых клетках. Эпигенетические изменения регулируются метилированием и модификацией гистоновых хвостов, и те и дргуие по сути связаны с энергетическим (нутриентным) статусом клеток, так как им требуется доступность ко-факторов, напр. ацетил CoA требуется для гистонового ацетилирования (ref). Биосинтез ацетил CoA зависит от гликолиза и цикла Кребса, прямо связанных со внутриклеточным энергетическим статусом для регуляции экспрессии и активности генов.

В нормальных клетках митохондриальное окислительное фосфорилирование производит значительное количество АТФ, соответствующее энергетическим нуждам для поддержания физиологической активности и поддержания жизни клетки. Следствием митохондриального вырабатывания энергии является образование химически активных кислородных радикалов (ROS), аберрантные продукты которых приводят к повреждению митохондрий (refs). Хорошо установлено, что постоянное образование ROS митохондриями

приводит к кумулятивной аккумуляции генетических мутаций, феномену, который участвует в этиологии канцерогенеза. Подтверждено, что в раковых клетках снижается митохондриальное дыхание для минимизации образования ROS, и происходит переключение на гликолиз для поддержания образования энергии. Таким образом, постепенное переключение образования энергии с окислительного фосфорилирования на гликолиз было бы необходимым для клеток для поддержания образования энгергии, поддержания физиологических функций и могло быть связано с движением фенотипа нормальной клетки в сторону раковой клетки. Постепенное переключение клеточного энергетического (биоэнергетического) профиля в совокупности с накопившимися изменениями (мутациями) в митохондриальном геноме приводит к изменениям в клеточном метаболизме. Изменения в метаболическом профиле всей клетки вследствие перехода от митохондриального фосфорилирования к гликолизу соответствуют анормальной биоэнергетике, вызыванной метаболическоим профилем и более глубокими причинами, поддерживающими канрцерогенез. Целевое вмешательство с использованием эндогенных молекул для вызова клеточного метаболического переключения к условиям неканцерогенного нормального митохондриального окислительного фосфорилирования, связанного с клеточным биоэнергетическим статусом, представляет собой терапевтический критерий эффективности в лечении рака.

Коэнзим Q10 как MBM, вызывающая эпи-метаболическое переключение

Данные, представленные здесь, демонстрируют, что лечение нормальных и раковых клеток коэнзимом Q10 связано с изменениями в экспрессии белков, которые регулируют ключевые биохимические точки в континууме гликолиз – митохондриальный окислительный стресс. Комбинация данных, описывающих оценку экспрессии белков иммуноблоттингом и степенями кислородного потребления демонстрирует, что в нормальных клетках нет значимых изменений в нормальных степенях гликолиза и митохондриального дыхания вследствие воздействия коэнзима Q10. Таким образом, значения экспрессии белков и степени митохондриального дыхания в нормальных клеточных линиях, напр. HDFa (нормальные фибробласты взрослого человека), HASMC (нормальные гладкие мускульные клетки аорты человека), nFib (нормальные фибробласты) и HeKa (нормальные кератиоциты человека) можно рассматривать как отображающие

базовый физиологический статус. Любые отклонения в экспрессии белков и степени митохондриального дыхания в линиях раковых клеток, напр. HepG2 (рак печени), PaCa-2 (рак поджелудочной железы), MCF7 (рак молочной железы), SK-MEL (меланома) и SCC-25 (плоскоклеточная карцинома), представляет изменение вследствие возникновения/прогрессирования болезни, в данном случае рака. Экспериментальные доказательства поддерживают гипотезу, что воздействие коэнзима Q10 на раковые клетки связано с клеточной патофизиологической реорганизацией, которая вспоминает о нормальных клетках. Именно, приведенные здесь данные демонстрируют, что воздействие коэнзима Q10 на раковые клетки связанос переключением в гликолитических путях и митохондриалном окислительном фосфорилировании, отвечающем за индукцию глобальной реорганизации клеточной архитектуры к наблюдаемой в нормальных клетках.

В нормальных клетках, конец гликолитического производства связан с митохондриальным окислительным фосфорилированием (OXPHOS), т.е. генерацией пирувата из глюкозы через глюкозный путь для вхождения в цикл Кребса (также известный как цикл трикарбоксильной кислоты, TCA, или цикл лимонной кислоты) для образования восстановленных эквивалентов для поддержания митохондриального OXPHOS для образования АТФ. Таким образом, в нормальных клетках экспрессия и функциональная ориентация генного продукта, участвующего в гликолизе, служит затравкой адекватной генерации пирувата и его вхождению в цикл Кребса. Дисрегулируемая экспрессия и функция клюевых белков, участвующих в путях гликолиза и цикла Кребса в раковых клетках приводит к повышению гликолиза со значительным снижением митохондриальной функции. Воздействие на раковые клетки коэнзима Q10, эндогенной молекулы, которая селективно влияет на митохондриальную дыхательную цепь, влияет (нормализует) экспрессию белков путей гликолиза и цикла Кребса, содействуя биоэнергетическому переключению, так что образование энергии (т.е. генерация АТФ) восстанавливается в митохондриях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Иммуноблоттинг Эксперимент 1

Клетками, использовавшимися для эксперимента, были HDFa и MCF-7 клетки, которые обрабатывались или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ и 100 мкМ, и собирались через 24 часа после обработки.

Весь клеточный осадок сразу же ресуспендировался в 1 мл C7 буфера и переносился в меченые 15 мл тубы. Образцы затем подвергались обработке ультразвуком в холодной комнате на льду с использованием 6 ультразвуковых импульсов с шагом #14. Образцы центрифугировались короткое время на 2500 г после обработки ультразвуком и переносились в 2 мл пробирки. У каждого образца проверялось pH (pH должно быть 9,0) с использованием пены, остававшейся в 50 мл пробирке.

Алкилирование и восстановление проб осуществлялась для каждой пробы добавлением 10 мкл 1M акриламида, 25 мкл трибутилфосфена и инкубацией в течение 90 мин. со прерывистым смешиванием. После инкубации 10 мкл 1M DTT добавлялось и пробирки центрифугировались при 20000 г и 20 градусах C в течение 10 минут, и супернатант переносился в помеченные Amicon Ultra фильтры для центрифугирования с 10 k сечениями (Millipore catalog # UFC 801024). Образцы 2 раза центрифугировались по 15 минут на 2500 г. Проводимость оценивалась только для чапсов. Если проводимость проб была высокой, тогда 1 мл чапсов добавлялось и снова центрифугировалось на 2500 г , пока объем не снижался до 250 мкл. Если проводимость была 200 или менее, образцы центрифугировались на 5 мин. интервалах при 2500 г пока объем супернатанта не становился между 150-100 мкл. Пробы супернатанта переносились в эппендорфы и делался анализ Брадфорда с использованием BSA как стандарта.

Пробы были обработаны по стандартному протоколу, как описано выше, и количество белка на каждую пробу определялось по анализу Брадфорда. Объемы проб, эквивалентные 10 мкг белка, были приготовлены, как показано ниже, с красителем Lamelli Loading (LDS) и MilliQ водой, и разгонялись в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле (Invitrogen, cat # NP0323Box)

Гели разгонялись в течение 50 минут с использованием 1X MOPS буфера, с использованием NOVEX Xcell Surelock системы при 200 В. Гели затем переносились в течение 1 часа с использованием NOVEX Xcell Surelock протокола влажного переноса при 30 В. Блоты красились с Simply Blue Safestain от Invitrogen (LC6065).

IDH1 и АТФ Цитрат лиазы уровни в HDFa и MCF-7 образцах.

После переноса каждый блот был помещен между 2 бумажными фильтрами Whatman и высушен в течение 15-20 минут. После сушки на блотах HB

карандашом были помечены дата, тип образца и номер блота (1 или 2) . Молекулярный вес маркеров был очерчен карандашом с одной линией для голубого и двойной для цветного маркера. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Блот 1 был зондирован первичным антителом для IDH1 (Cell Signaling # 3997) в TBST с 5% BSA (разведение 1:1000) и блот 2 с кроличьим поликлональным антителом для АТФ цитрата лиазы в 5% BSA (Cell Signaling #4332) при разведении 1:1000 и инкубировался на ночь при 4 градусах С с перемешиванием. После ночной инкбации с первичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондированы вторичными антителами (антикроличьи; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубированы с ECF реагентом в течение 5 мин. и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни актина в HDFa и MCF-7 образцах.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота были сканированы на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондированы вторичным антителом (антимышиные; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами, блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Иммуноблоттинг эксперимент 2

Клетками, использованными в этом эксперименте, были SKMEL28, SCC-25, nFib и Heka, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ или 100 мкМ, и собраны после 3, 6 и/или 24 часов обработки. Пробы были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Уровни IDH1 для 4 клеточных линий

После переноса блот был высушен в течение 15-20 минут, активирован метанолом 5 секунд, промыт водой 5 минут и TBST 15 минут. Блот блокировался в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондирован вторичным антителом (антимышиные; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами, блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Блот блокировался в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Затем блот зондировался первичным антителом для IDH1 (Cell Signaling # 3997) в TBST с 5% BSA (разведение 1:1000) на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночной инкбации с первичными антителами блот промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (антикроличьи; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

АТФ цитрат лиазы уровни в 4 различных клеточных линиях.

Изоцитрат дегидрогеназы блот был зачищен путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блот сканировался на

лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блот активировался метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блот блокировался в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Затем блот зондировался кроличьим поликлональным антителом к АТФ цитрат лиазе в 5% BSA (Cell Signaling #4332) при разведении 1:10000 на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночой инкубации с первичными антителами к АТФ цитрат лиазе блот промывался 3 раза TBS-T (X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (антикроличьи; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни актина в 4 различных клеточных линиях.

Изоцитрат дегидрогеназы блот был зачищен путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блот сканировался на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блот активировался метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блот блокировался в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (X-15'; 2X 5' каждый) и зондировался антителом к Актину в 5% BSA (Sigma catalog # A5316, клон AC-74) 1:5000 разведение на 1 час при комнатной температуре на шейкере. После 1 часа инкубации с первичными антителами к Актину мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и были зондированы вторичными антителами (антимышиные; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Имммуноблоттинг эксперимент 3

Клетками, использованными в этом эксперименте, были HepG2, HASMC, и PACA2 клетки которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 48 часов после обработки. В этом эксперименте (иммуноблоттинг эксперимент 3) и во всех экспериментах, описанных ниже в этом примере (т.е. иммуноблоттинг эксперименты с 4 по 9), клетки были дополнительно обработаны или 5 мМ глюкозой ("5G") или 22 мМ глюкозой ("22G"). Образцы, взятые из клеток, были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

IDH1, АТФ цитрат лиазы и актина уровни в HASMC vs. PACA2 и HepG2.

Уровни IDH1, АТФ цитрат лиазы и актина были определены путем зондирования блотов первичными антителами к IDH1, АТФ цитрат лиазе и актину, в основном как описано выше.

Иммуноблоттинг эксперимент 4

Клетками, использованными в этом эксперименте, были HepG2 клетки которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 часов после обработки. Образцы были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Уровни лактат дегидрогеназы в* HepG2 *клетках.

После переноса каждый блот был высушен в течение 15-20 минут, активирован метанолом 5 секунд, промыт водой 5 минут и TBST 15 минут. Блот блокировался в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). и зондирован первичным антителом к лактатдегидрогеназе (abcam ab2101; поликлональные) в 5% BSA (1:10000 разведение) на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночой инкубации с первичными антителами к АТФ цитрат лиазе блот промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (кроличьи антикоза; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами

блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Пируват киназы мышечной формы (PKM2) уровни в HepG2 клетках.

Лактата дегидрогеназы блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались кроличьим поликлональным антителом к Пируват киназе М2 в 5% BSA (Novus Biologicals catalog # H00005315-D01P) 1:500 разведение на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночой инкубации с первичными антителами к Пируват киназе М2 мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикроличьи; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни пируват дегидрогеназы бета в HepG2 клетках.

Пируват киназы блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. После того как убедились, что зачистка антитела и ECF реагент работает, блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Пируват дегидрогиназе М2 в 5% BSA (ABNOVA

catalog # H00005162-M03) 1:500 разведение на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночой инкубации с первичными антителами к Пируват дегидрогеназе мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антимышиные; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни актина в HepG2 клетках.

Пируват дегидрогеназы блоты были зачищены и затем вновь зондированы антителами к актину, как описано выше.

Иммуноблоттинг Эксперимент 5

Клетками, использованными в этом эксперименте, были MIAPACA2 (PACA2) клетки которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 часов после обработки. PACA2 образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Лактат дегидрогеназы (LDH) и Пируват дегидрогеназы (PDH) уровни в PaCa2 клетках

Уровни LDH и PDH определялись путем зондирования блотов подряд первичными антителами к LDH и PDH, по существу как описано выше.

Каспазы 3 уровня в PaCa2 клетках.

Блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Каспазе 3 в 5% BSA (Santacruz Biotechnology #

sc7272) 1:200 разведение на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночой инкубации с первичными антителами к Каспазе 3 мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антимышиные; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Иммуноблоттинг Эксперимент 6

Клетками, использованными в этом эксперименте с иммуноблоттингом, были PC-3, HepG2, MCF-7, HDFa и PACA2, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 IV формулой и собраны через 24 часа после обработки. Образцы были обработаны и гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Каспаза 3 и уровни Актина в различных клеточных типах.

Уровни Каспазы 3 и актина определялись зондированием блотов первичными антителами к Каспазе 3 и актину, как описано выше.

Иммуноблоттинг Эксперимент 7

Клетками, использованными в этом эксперименте, были клетки гладкой мускулатуры аорты человека (HASMC), которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 часов после обработки. PACA2 образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Актина:

Уровни актина определялись зондированием блотов первичными антителами к актину, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Hif 1alpha, Каспазы 3 и PDHB:

Актиновые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались

на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Hif 1 alpha, Каспазе 3 или PDHB в 5% BSA (1:200 при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Hif 1 alpha (Abcam ab2185; антикроличье) были разведены 1:500 в 5% BSA. Первичные антитела к Каспазе 3 (Santacruz sc7272; антикроличье) были разведены 1:200 в 5% BSA. Первичные антитела к пируват дегидрогеназе бета (PDHB) (Novus Biologicals H00005162-M03; антимышиное) были разведены 1:500 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (PDHB антимышиное; Hif 1a и Каспаза 3 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для PKM2, SDHB и SDHC:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к PKM2, SDHB или SDHC в 5% BSA в TBS-T (1:200 при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к SDHC (ABNOVA H00006391-M02; антимышиное) были разведены 1:500. Первичные антитела к SDHB были из Abcam ab4714-200; антимышиное; были разведены 1:1000. Первичные антитела к пируваткиназе M2 (PKM2) были из Novus Biologicals H00005315-D0IP; антикроличье; были разведены 1:500. После

инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (SDHB & C антимышино; и PKM2 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для LDH и Bik:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к LDH или Bik в 5% BSA в TBS-T при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к LDH были из Abcam ab2101; антикозье; были разведены 1:1000. Первичные антитела к Bik были из Cell Signaling #9942; антикроличье; были разведены 1:1000. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (LDH антикозье; Jackson Laboratories) и Bik антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Иммуноблоттинг Эксперимент 9

Использованными клетками были HepG2, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ и 100 мкМ, и собраны через 24 или 48 часов после обработки. HepG2 образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Актина:

Уровни актина определялись зондированием блотов первичными антителами к актину, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Каспазы 3 и MMP-6:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Каспазе 3 или MMP-6 в 5% BSA в TBS-T при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Каспазе 3 (Abcam ab44976-100; антикроличье) были разведены 1:500 в 5% BSA. Первичные антитела к MMP-6 (Santacruz scMM0029-ZB5; антимышиное) были разведены 1:100 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (MMP-6 антимышиное; каспаза 3 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для LDH:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый)

и зондировались антителом к LDH в 5% BSA или 5% сыворотке при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к LDH 080309b1 (Abcam ab2101; антикозье) были разведены 1:1000 в 5% BSA. Первичные антитела к LDH 080309b2 (Abcam ab2101; антикозье) были разведены 1:100 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (Jackson Immuno Research антикозье; 1:10000 разведение; 305-055-045) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для трансальдолазы и Hif1a:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Трансальдолазе или Hif1a в 5% BSA при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Трансальдолазе (Abcam ab67467; антимышиное) были разведены 1:500. Первичные антитела к Hif1a (Abcam ab2185; антикроличье) были разведены 1:500. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антимышиное или антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для IGFBP3 и TP53:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителами к IGFBP3 или TP53 в 5% BSA при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к IGFBP3 (Abcam ab76001; антикроличье) были разведены 1:100. Первичные антитела к TP53 (Sigma Aldrich AV02055; антикроличье) были разведены 1:100. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикроличье; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для Трансальдолазы и PDHB:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 минут в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50 градусах С, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителами к Трансальдолазе или PDHB в 5% BSA при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Трансальдолазе (Santacruz sc51440; антикозье) были разведены 1:200. Первичные антитела к PDHB (Novus Biologicals H00005162-M03; антимышиное) были разведены 1:500. После инкубации с первичными антителами мембраны

промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикозье или антимышиное; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изоцитрат дегидрогеназа - 1 (IDH-1)

Изоцитрат дегидрогеназа – один из ферментов, который является частью TCA цикла, который обычно присутствует внутри митохондриального матрикса. Однако IDH1 является цитоплазматической формой энзима, которая катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата в α-кетоглутарат и вырабатывает диоксид углерода в двухэтапном процессе. IDH1 является $НАДФ^+$ зависимой формой, которая присутствует в цитоплазме и пероксисоме. IDH1 инактивируется Ser113 фосфорилированием и экспрессируется во многих видах, включая те, у которых нет цикла лимонной кислоты. Судя по всему, в норме IDH1 функционирует как супрессор опухолей, который при инактивации способствует онкогенезу, частично за счет активации HIF-1 пути (Bayley 2010; Reitman, 2010). Недавние исследования вовлекли инактивирующие мутации в IDH1 в этиологию глиобластомы (Bleeker, 2009; Bleeker, 2010).

Обработка коэнзимом Q10 повышала экспрессию IDH1 в линиях раковых клеток, включая MCF-7, SKMEL28, HepG2 и PaCa-2 клетки. Было среднее возрастание экспрессии в SCC25 клеточных линиях. Напротив, культуры первичных фибробластов человека HDFa, nFIB и клеток гладкой мускулатуры аорты человека HASMC не показали значительных изменений в экспрессионном паттерне IDH1в ответ на коэнзим Q10. α-кетоглутарат (α-КГ) является ключевым промежуточным продуктом в цикле TCA, биохимически синтезируемым из изоцитрата и в конечном итоге превращающемся в сукцинил coA и являющимся лекарственно-ориентированным MBM и эпи-переключателем. Образование α-КГ служит критическим местом связи в TCA цикле, поскольку может использоваться клеткой для пополнения промежуточных веществ в цикле, приводя к образованию восстановленных эквивалентов и возрастанию окислительного фосфорилировния.

Таким образом, кооэнзим Q10, опосредуя возрастание экспрессии IDH1, приводит к формированию промежуточных продуктов, которые могут быть использованы в митохондриальном TCA цикле для увеличения окислительного фосфорилирования в раковых клетках. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 75 IDH1 в HDFa и MCF-7

Состав	**Средняя нормализованная интенсивность**
HDF, среда	346
HDF24-50-Коэнзим Q10	519
HDF24-100-Коэнзим Q10	600
MCF, среда	221
MCF24-50-Коэнзим Q10	336
MCF24-100-Коэнзим Q10	649

Таблица 76 IDH1 в HASMC vs. HepG2 после обработки

Количество - Состав	**Нормализованная интенсивность**
HAS5g48-среда	20
HAS5g48-50-Коэнзим Q10	948
HAS5g48-100-Коэнзим Q10	1864
HAS22G48-Среда	1917
HAS22G48-50-Коэнзим Q10	1370
HAS22G48-100-Коэнзим Q10	1023
Hep5g48-Среда	14892
Hep5g48-50-Коэнзим Q10	14106
Hep5g48-100-Коэнзим Q10	15774
Hep22G48-Среда	16558
Hep22G48-50-Коэнзим Q10	15537
Hep22G48-100-Коэнзим Q10	27878

Таблица 77 IDH1 в HASMC vs. PACA2 после обработки

Количество - Состав	**Нормализованная интенсивность**
HAS5g48-Среда	562
HAS5g48-50-Коэнзим Q10	509
HAS5g48-100-Коэнзим Q10	627
HAS22G48-Среда	822
HAS22G48-50-Коэнзим Q10	1028
HAS22G48-100-Коэнзим Q10	1015
PACA5g48-Среда	1095
PACA5g48-50-Коэнзим Q10	1095
PACA5g48-100-Коэнзим Q10	860
PACA22G48-Среда	1103
PACA22G48-50-Коэнзим Q10	1503
PACA22G48-100-Коэнзим Q10	1630

АТФ Цитрат Лиаза (ACL)

АТФ цитрат лиаза (ACL) является гомотетрамерным (~126 кд) ферментом, который катализирует образование ацетил-CoA и оксалоацетата в цитоплазме. Эта реакция является очень важным первым этапом в биосинтезах жирных кислот, холестерина и ацетилхолина, а также для глюкогенеза (Towle et al., 1997). Питательные вещества и гормоны регулируют уровень экспрессии и фосфориляционный статус этого ключевого фермента. Сообщалось о Ser454 фосфорилировании ACL благодаря Akt и PKA (Berwick., DC MW et al., 2002; Pierce MW et al., 1982).

Данные описывают действие коэнзима Q10 на АТФ цитат лиазу в нормальных и раковых клетках. Постоянно наблюдается, что в раковых клетах существует дозозависимое снижение экспрессии ACL ферментов. И, напротив, судя по всему существует тенденция возрастания экспрессии ACL в нормальных клетках. Цитоплазматический ACL демонстрирует необходимость для ацетилирования гистонов в клетке во время стимуляции фактора роста и во время дифференцировки. Тот факт, что ACL утилизирует цитоплазматической глюкозы дериват цитрат для образования Ацетил CoA, необходимого для ацетилирования

гистонов, процесса, важного в процессе новообразований, демонстрирует роль коэнзима Q10, вызывающего экспрессию ACL, влияющего на функцию раковых клеток. Ацетил CoA, вырабатывающийся из цитрата благодаря цитоплазматическому ACL, служит источником для биосинтезов новых липидов и холестерина во время деления клеток. Таким образом, коэнзим Q10, вызывающий изменения в экспрессии ACL, влияет на способность Ацетил CoA синтезировать липиды и хотестерин в нормальных клетках по сравнению с раковыми клетками. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 78 ATPCL в HDFa и MCF-7

Состав	**Средняя нормализованная интенсивность**
HDF-Среда	~ 15000
HDF-50-Коэнзим Q10	~ 17500
HDF-100-Коэнзим Q10	~ 25000
MCF-Среда	~ 7500
MCF-50-Коэнзим Q10	~7500
MCF-100-Коэнзим Q10	~ 12500

Таблица 79 ATP цитрат лиаза ~kd полоса в HASMC vs. HepG2

Количество – состав	**Нормализованная интенсивность**
HAS5g48-среда	24557
HAS5g48-50-Коэнзим Q10	23341
HAS5g48-100-Коэнзим Q10	25544
HAS22G48-среда	27014
HAS22G48-50-Коэнзим Q10	21439
HAS22G48-100-Коэнзим Q10	19491
Hep5g48-среда	28377
Hep5g48-50-Коэнзим Q10	24106
Hep5g48-100-Коэнзим Q10	22463
Hep22G48-Среда	24262
Hep22G48-50-Коэнзим Q10	31235

Hep22G48-100-Коэнзим Q10	50588

Таблица 80 АТФ цитрат лиаза ~кд полоса в HASMC vs. PACA2

Количество – Состав	**Нормализованная интенсивность**
HAS5g48-среда	11036
HAS5g48-50-Коэнзим Q10	12056
HAS5g48-100-Коэнзим Q10	15265
HAS22G48-среда	18270
HAS22G48-50-Коэнзим Q10	15857
HAS22G48-100-Коэнзим Q10	13892
PACA5g48-среда	11727
PACA5g48-50-Коэнзим Q10	8027
PACA5g48-100-Коэнзим Q10	4942
PACA22G48-среда	8541
PACA22G48-50-Коэнзим Q10	9537
PACA22G48-100-Коэнзим Q10	14901

Таблица 81 АТР цитрат лизаза в HepG2 и PACA2 как % от CTR

Количество - Состав	**Нормализованная интенсивность**
PACA5g48-среда	1,00
PACA5g48-50-Коэнзим Q10	0,68
PACA5g48-100-Коэнзим Q10	0,42
PACA22G48-среда	1,00
PACA22G48-50-Коэнзим Q10	1,12
PACA22G48-100-Коэнзим Q10	1,74
Hep5g48-среда	1,00
Hep5g48-50-Коэнзим Q10	0,85
Hep5g48-100-Коэнзим Q10	0,79
Hep22G48-среда	1,00
Hep22G48-50-Коэнзим Q10	1,29

Hep22G48-100-Коэнзим Q10	2,09

Пируват Киназа М2 (PKM2)

Пируват киназа является ферментом, участвующем в гликолитическом пути. Она отвечает за перенос фосфата с фосфоенолпирувата (PEP) на аденозиндифосфат (АДФ) с образованием АТФ и пирувата. PKM2 является изоэнзимом гликолитической пируваткиназы, экспрессия которого характеризуется по метаболитической функции ткани, т.е. М2 изоэнзим экспрессируется в нормальных быстро пролиферирующих клетках с высокими энергетическими потребностями, такими как эмбриональные клетки, и также экспрессируется в нескольких нормальных дифференцированных тканях, таких как легкие и инсулоциты поджелудочной железы, где требуется высокая степень синтеза нуклеиновых кислот. PKM2 в высокой степени экспрессируется в опухолевых клетках вследствие своей зависимости от гликолитического пути, отвечающего энергетическим потребностям клетки. PKM2 изоформа, в норме считающаяся ограниченной эмбриональным периодом, ре-экспрессируется в раковых клетках. Клетки, экспрессирующие PKM2, поддерживают сильный аэробный гликолитический фенотип (показывающий переключение в метаболитическом фенотипе) с возрастанием образования лактата и снижением окислительного фосфорилирования. Таким образом, снижение экспрессии PKM2 в раковых клетках переключает или отрицательно регулирует образование энергии благодаря гликолитическому пути, стратегии, которая полезна в лечении рака. Данные демонстрируют различный паттерн экспрессии PKM2 в нормальных и раковых клетках, где раковые клетки демонстрируют более высокий уровень экспрессии по сравнению с нормальными. Обработка клеток коэнзимом Q10 изменяет экспрессионный паттерн PKM2 выше и ниже исходных уровней в нормальных и раковых клетках (фигуры 81-85). В исследуемых раковых клетках существует дозозависимое снижение экспрессии PKM2, и в основном не наблюдается изменений в нормальных клетках. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 82 Пируваткиназа мышечная форма 2 верхняя полоса в HepG2

Количество -	**Нормализованный**	**Нормализования**

Состав	объем (24 ч)	интенсивность (48 ч)
5г-Среда	28386	413
5г-50-Коэнзим Q10	29269	303
5г-100-Коэнзим Q10	18307	354
22Г-Media	25903	659
22-50-Коэнзим Q10	22294	562
22G-100-Коэнзим Q10	19560	601

Таблица 83 Пируваткиназа мышечная форма 2 нижняя полоса (58 КД) в HepG2

Количество - Состав	Нормализованный объем (24 ч)	Нормализованный объем (24 ч)
5г-Среда	10483	310
5г-50-Коэнзим Q10	11197	185
5г-100-Коэнзим Q10	7642	122
22G-Среда	9150	306
22G-50-Коэнзим Q10	6302	344
22G-100-Коэнзим Q10	6904	465

Таблица 84 Пируваткиназа мышечная форма 2 верхняя полоса в HASMC клетках после обработки

Количество - Состав	Нормализованная интенсивность
5г48-Среда	608
5г48-50-Коэнзим Q10	811

5г48-100-Коэнзим Q10	611
22G48-Среда	516
22G48-50-Коэнзим Q10	595
22G48-100-Коэнзим Q10	496
22G24-Среда	301
22G24-50-Коэнзим Q10	477
22G24-100-Коэнзим Q10	701

Лактат дегидрогеназа (LDH)

LDH является ферментом, который катализирует взаимное превращение пирувата и лактата с одновременным взаимным превращением НАДН и $НАД^+$. Он обладает способностью превращать пируват в лактат (молочную кислоту) при низком давлении кислорода в клетке для образования восстановленных эквивалентов и образования АТФ за счет митохондриального окислительного фосфорилирования. Раковые клетки обычно демонстрируют повышенную экспрессию LDH для поддержания гликолитического потока для образования АТФ и восстановленных эквивалентов и уменьшения митохондриального OXPHOS. Таким образом, уменьшение экспрессии LDH в раковых клетках переключает метаболизм с образования лактата на содействие входу пирувата в TCA цикл. Обработка коэнзимом Q10 уменьшала экспрессию лактатдегидрогеназы (LDH) при раке с минимальным действием на нормальные клетки, поддерживая роль коэнзима Q10 в вызове переключения в биоэнергетике раковых клеток для образования АТФ с гликолитического на митохондриальные OXPHOS источники путем минимизации превращения цитоплазматического пирувата в молочную кислоту. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 85 Лактат дегидрогеназа в HepG2

Количество - Состав	**Нормализованный объем (24 ч)**	**Нормализованный объем (48 ч)**
5г-Среда	7981	5997
5г-50-Коэнзим Q10	7900	5188
5г-100-Коэнзим Q10	6616	7319

22G-Среда	9171	7527
22G-50-Коэнзим Q10	7550	6173
22G-100-Коэнзим Q10	7124	9141

Таблица 86 Лактат дегидрогеназа в HepG2 как % контроля от 2 экспериментов

Количество - Состав	**Средний объем как % от контроля**
5g24-Среда	1,00
5g24-50-Коэнзим Q10	0,64
5g24-100-Коэнзим Q10	1,06
5g48-Среда	1,00
5g48-50-Коэнзим Q10	1,12
5g48-100-Коэнзим Q10	1,21
22G24-Среда	1,00
22G24-50-Коэнзим Q10	1,21
22G24-100-Коэнзим Q10	1,44
22G48-Среда	1,00
22G48-50-Коэнзим Q10	0,95
22G48-100-Коэнзим Q10	0,67

Таблица 87 Лактатдегидрогеназа в PACA

Количество - Состав	**Нормализованный объем (24 ч)**	**Нормализованный объем (48 ч)**
5г-Среда	2122	2360
5г-50-Коэнзим Q10	5068	2978
5г-100-Коэнзим Q10	3675	2396
22G-Среда	4499	2332

22G-50-Коэнзим Q10	10218	2575
22G-100-Коэнзим Q10	7158	3557

Пируват Дегидрогеназа – B (PDH-E1)

Пируват дегидрогеназа бета (PDH-E1) является первым ферментным компонентом, который является частью пируватдегидрогеназного комплекса (PDC), который превращает пируват в ацетилCoA. PDH-E1 требует тиамина как кофактора для своей активности, осуществляет первые две биохимические реакции в PDC комплексе, необходимые для превращения пирувата в ацетилCoA для вхождения в TCA цикл в митохондриях. Таким образом, сопутствующее снижение экспрессии PKM2 и LDH в ходе возрастания экспрессии PDH-E1 в раковых клетках увеличивает степень вхождения пирувата для усиления митохондриального OXPHOS для образования АТФ. Данные показывают, что экспрессия PDH-E1 в нормальных и раковых клеточных линиях, исходная линия экспрессии этого фермента уменьшается при раке по сравнению с нормальными клетками. Воздействие коэнзимом Q10 связано с прогрессивным повышением экспрессии PDH-E1 белков в раковых клетках при минимальных изменениях в нормальных клетках. Результаты суммаризованы в таблицах ниже.

Таблица 88 Пируват дегидрогеназа бета в HepG2

Количество - Состав	**Нормализованный объем (24 ч)**	**Нормализованный объем (48 ч)**
5г-Среда	517	100
5г-50-Коэнзим Q10	921	123
5г-100-Коэнзим Q10	433	205
22G-Среда	484	181
22G-50-Коэнзим Q10	426	232
22G-100-Коэнзим Q10	340	456

Таблица 89 Пируват дегидрогеназа бета в PACA2

Количество - Состав	Нормализованный объем (48 ч)	Нормализованный объем (48 ч)
5г-Среда	323	375
5г-50-Коэнзим Q10	492	339
5г-100-Коэнзим Q10	467	252
22G-Среда	572	276
22G-50-Коэнзим Q10	924	279
22G-100-Коэнзим Q10	1201	385

Таблица 90 Пируват дегидрогеназа бета в HASMC после обработки

Количество - Состав	Нормализованный объем
5г48-Среда	140
5г48-50-Коэнзим Q10	147
5г48-100-Коэнзим Q10	147
22G48-Среда	174
22G48-50-Коэнзим Q10	149
22G48-100-Коэнзим Q10	123
22G24-Среда	140
22G24-50-Коэнзим Q10	145
22G24-100-Коэнзим Q10	150

Каспаза 3

Контроль начала апоптозов часто влияет на уровень инициатора каспаз, каспазы-2, -9 и -8/10. Во внешнем пути апоптозов, каспаза-8 активируется, прямо расщепляется и активирует каспазы-убийцы (такие как каспаза-3). Активная каспаза-3 расщепляет и активирует другие каспазы (6, 7, и 9), а также и соответствующие цели в клетках (напр., PARP и DFF). В этих исследованиях уровни эффекторов белка каспазы-3 оценивались в раковых клеточных линиях и в нормальных клеточных линиях в ответ на коэнзим Q10. Следует заметить, что хотя считается, что контроль за апоптозами идет через инициатора каспаз,

множество сигнальных путей прерывается взамен передачи апоптозного сигнала через прямую ингибицию эффекторов каспаз. Для, напр., P38 MAPK фосфорилирует каспазу-3 и поддерживает ее активность (Alvarado-Kristensson et al., 2004). Интересно, что активация белка фосфотазы (PP2A) в том же исследовании или протеинкиназы С дельта (PKC дельта) (Voss et al., 2005) может препятствовать действию p38 MAPK усиливать активацию каспазы-3 и содействовать передаче апоптозного сигнала. Следовательно, события на уровне активации каспазы-3 или после активации каспазы-3 могут определять конечную судьбу клетки в некоторых случаях.

Каспаза-3 является цистеин-аспаргиновой кислоты протеиназой, которая играет центральную роль в фазе осуществления клеточного апоптоза. Уровни каспазы 3 в раковых клетках возрастали при обработке коэнзимом Q10. Напротив, экспрессия каспазы-3 в нормальных клетках умеренно понизилась. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 91 Каспаза 3 в PACA2

Количество - Состав	**Нормализованный объем (24 ч)**	**Нормализованный объем (24 ч)**
5г-Среда	324	300
5г-50-Коэнзим Q10	325	701
5г-100-Коэнзим Q10	374	291
22G-Среда	344	135
22G-50-Коэнзим Q10	675	497
22G-100-Коэнзим Q10	842	559

Таблица 92 Каспаза 3 в HepG2 клетках как % контроля от 2 экспериментов

Количество - Состав	**Нормализованный объем как % от контроля**
5г24-Среда	1,00
5г24-50-Коэнзим Q10	1,08
5г24-100-Коэнзим Q10	1,76
5г48-Среда	1,00

5г48-50-Коэнзим Q10	1,44
5г48-100-Коэнзим Q10	0,95
22G24-Среда	1,00
22G24-50-Коэнзим Q10	1,39
22G24-100-Коэнзим Q10	1,78
22G48-Среда	1,00
22G48-50-Коэнзим Q10	1,50
22G48-100-Коэнзим Q10	1,45

Таблица 93 Каспаза 3 в HASMC после обработки

Количество - Состав	**Нормализованный объем**
5г48-Среда	658
5г48-50-Коэнзим Q10	766
5г48-100-Коэнзим Q10	669
22G48-Среда	846
22G48-50-Коэнзим Q10	639
22G48-100-Коэнзим Q10	624
22G24-Среда	982
22G24-50-Коэнзим Q10	835
22G24-100-Коэнзим Q10	865

Сукцинат дегидрогеназа (SDH)

Сукцинат дегидрогеназа, также известная как сукцинат-коэнзим Q редуктаза, является комплексом внутренней митохондриальной мембраны, которая задействована и в TCA, и в электронной транспортной цепи. В TCA этот комплекс катализирует окисление сукцината до фумарата с сопутствующим восстановлением убихинона до убихинола. (Baysal et al., Science 2000; и Tomlinson et al., Nature Genetics 2002). Обнаружено, что генеративные мутации в SDH B, C и D субъединицах инициируют события семейной параганглиомы или лейомиомы (Baysal et al., Science 2000).

Иммуноблоттинг использовался для характеристики экспрессии SDH

субъединицы B в митохондриальных препаратах раковых клеток, обработанных коэнзимом Q10. Результаты подтверждают, что обработка коэнзимом Q10 связана с возрастанием уровней SDH белка в митохондриях клеток. Эти результаты подтверждают, что одним из механизмов действия коэнзима Q10 является переключение метаболизма клеток на TCA цикл и на митохондрии благодаря возрастанию уровней митохондриальных ферментов, таких как SDHB. Результаты суммированы в таблице ниже.

Таблица 94 Сукцинат дегидрогеназа B в NCIE0808 митопрепаратах

Состав - Время	**Средний нормализованный объем**
Среда	531
50 мкМ Коэнзим Q10, 3ч	634
100 мкМ Коэнзим Q10, 3ч	964
50 мкМ Коэнзим Q10, 6ч	1077
100 мкМ Коэнзим Q10, 6ч	934

Индуцирующий гипоксию фактор - 1

Индуцирующий гипоксию фактор (Hif) является транскрипционным фактором, состоящим из альфа и бета субъединиц. При нормоксии уровни белка Hif1 альфа очень низкие вследствие его постоянной деградации в последовательности посттрансляционных событий. Обычно считается, что переключение между гликолизом и окислительным фосфорилированием контролируется совместной активностью двух ферментов PDH и LDH, которые определяют катаболическую судьбу пирувата. Hif контролирует эту критическую точку бифуркации, индуцируя уровни LDH и ингибируя активность PDH путем стимуляции PDK. Благодаря своей способности отводить метаболизм пирувата от митохондрий в цитоплазму, Hif считается ключевым медиатором биоэнергетического переключения в раковой клетке.

Воздействие коэнзима Q10 снижает уровни белка Hif1 альфа в митохондриальных препаратах раковых клеток. В лизатах нормальных клеток также наблюдается более слабая полоса Hif1, показывающая снижение.

Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 95 Hif1 альфа слабая полоса в HASMC клетках после обработки

Количество - Состав	**Нормализованный объем**
5г48-Среда	22244
5г48-50-Коэнзим Q10	21664
5г48-100-Коэнзим Q10	19540
22G48-Среда	14752
22G48-50-Коэнзим Q10	17496
22G48-100-Коэнзим Q10	23111
22G24-Среда	21073
22G24-50-Коэнзим Q10	18486
22G24-100-Коэнзим Q10	17919

Таблица 96 Hif1 альфа более сильная полоса в HepG2 после обработки

Количество - Состав	**Нормализоавнный объем**
5г24-Среда	12186
5г24-50-Коэнзим Q10	8998
5г24-100-Коэнзим Q10	9315
5г48-Среда	8868
5г48-50-Коэнзим Q10	8601
5г48-100-Коэнзим Q10	10192
22G24-Среда	11748
22G24-50-Коэнзим Q10	14089
22G24-100-Коэнзим Q10	8530
22G48-Среда	8695
22G48-50-Коэнзим Q10	9416
22G48-100-Коэнзим Q10	5608

Пример 43 **Анализ степени потребления кислорода (OCR) и внеклеточной кислотности (ECAR) в нормальных и раковых клетках, обработанных CoQ10**

Этот пример демонстрирует, что воздействие на клетки репрезентативной MBM /эпи-переключателем изобретения - CoQ10 – в отсутствие и/или присутствие стрессора (напр., гиперглицемии, гипоксии, молочной кислоты), связано с переключением между гликолизом /биосинтезом лактата и митохондриальным окислительным фосфорилированием (как оценено по значениям ECAR и OCR), в сторону значений, наблюдаемых в нормальных клетках при нормальных физиологических условиях.

Заявители демонстрировали в предыдущих разделах, что воздействие CoQ10 на раковые клетки связано с изменениями экспрессии определенных белков, которые усиливают митохондриальное окислительное фосфорилирование, с сопутствующим снижением гликолиза и биосинтеза лактата. Этот пример показывает, что непосредственную оценку митохондриального окислительного фосфорилирования можно наблюдать путем подсчета степени потребления кислорода (OCR) в клеточных линиях с использованием SeaHorse XF анализатора, инструмента, который оценивает растворенный кислород и внеклеточные уровни в *in vitro* экспериментальной модели (SeaHorse Biosciences Inc, North Billerica, MA).

pH внеклеточного микроокружения сравнительно кислый в опухолях по сравнению с внутриклеточным (цитоплазматическим) pH и окружающими нормальными тканями. Этот характерный признак опухолей служит множеству целей, включая способность нарушать внеклеточный матрикс (ECM), отличительную черту опухолевых метастаз, которая впоследствии инициирует сигнальный каскад, который затем модулирует:

- ангиогенез в опухоли
- повышенную активацию механизма остановки, контролирующего включение-выключение клеточного цикла
- иммуномодулирующие механизмы, которые содействуют системе клеточной системы уклонения от иммунного надзора

- элементы метаболического контроля, которые повышают зависимость от гликолитического потока и потребления лактата
- дисрегуляцию ключевых семейств апоптозных генов, таких как Bcl-2, IAP, EndoG, AIF, которые служат возрастанию онкогенности

Не имея стремления ограничиваться какой-либо определенной теорией, кислая pH внешнего микроокружения в опухоли является последствием возрастания концентрации ионов водорода, вышедших из опухолевых клеток из-за возросшего образования лактата из-за изменившегося гликолитического фенотипа.

В этом эксперименте OCR и степень внеклеточной кислотности (ECAR) в нормальных клеточных линиях наблюдались в присутствие и отсутствие CoQ10 для определения базовых величин. Наблюдалось, что в своем естественном окружении базовые степени OCR в нормальных клеточных линиях различны, и обычно зависят от физиологической роли клеток в теле.

Например, одна серия экспериментов была проведена с использованием неканцерогенной клеточной линии HDFa, которая является клеточной линией дермальных фибробластов у взрослых людей. Фибробласты – клетки, которые в основном синтезируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса (ECM) и коллаген, который формирует структурный каркас (строму) тканей. Кроме того, известно, что фибробласты служат в ткани посредниками множества функций, таких как заживление мелких ран и местная иммуномодуляция. При нормальных физиологических условиях энергетические потребности нормальных фибробластов удовлетворяются использованием комбинации гликолиза и окислительного фосфорилировния – гликолиз предоставляет необходимые вещества для синтеза ECM.

В отличие от HDF, HASMC (клетки гладкой мускулатуры аорты человека) находятся в артериях, венах, лимфатических сосудах, пищеварительном тракте, дыхательных путях, мочевом пузыре и в других тканях со способностью подвергаться регулируемому возбуждению и сокращению. Способность гладких мускулов, таких как клетки HASMC, сокращаться, требует энергии, запасенной в АТФ. Эти ткани переходят от низкоэнергетической модели, когда АТФ может поставляться из митохондрий, к высокоэнергетической модели (во время физической активности/стресса), когда энергия предоставляется путем

переключения на гликолиз для быстрого образования АТФ. Таким образом, нормальные клетки гладкой мускулатуры могут использовать комбинацию митохондриального OXPHOS и гликолиза для удовлетворения своих энергетических потребностей в нормальном физиологическом состоянии.

Разница в их сравнительных физиологических ролях (т.е., HDFa и HASMC) наблюдалась в остаточных OCR значениях, подсчитанных в этих клеточных линиях с использованием SeaHorse XF анализатора. Фигуры 37 и 38 ниже описывают OCR в HDFa и HASMC клетках, растущих в условиях физиологически нормального количества глюкозы (около 4,6 мМ) и при повышенной глюкозе (гипергликемия).

Базовое значение OCR для HDFa в отсутствие каких-либо воздействий при нормальной доступности кислорода примерно 40 рмоль/мин (фигура 37; выше) в присутствии 5,5 мМ глюкозы. Это значение слегка повысилось, когда клетки содержали в 22 мМ глюкозе. Напротив, в клетках HASMC значения OCR при 5,5 мМ глюкозы примерно 90 пмоль/мин., и значение OCR уменьшилось до примерно 40 пмоль/мин. в присутствии 22 мМ глюкозы. Таким образом, в условиях гипергликемии существует различная реакция у HDFa и HASMC, что демонстрирует врожденные различия в их соответствующем физиологическом складе и функциях.

Обработка CoQ10 в клетках связана с изменениями в OCR, которая проявляется в условиях, наблюдаемых при нормальных глюкозных условиях (5 мМ). Сложность физиологического ответа соответствует присутствию малой плотности кислорода. Таким образом, влияние CoQ10 связано с изменениями в степенях OCR в нормальных клетках в сторону физиологического статуса, который присущ определенным типам клеток.

Таблица 97 ниже описывает значения ECAR (мрН/мин) в HDFa клетках в присутствии или отсутствии CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы. Можно видеть, что у нормальных клеток обработка CoQ10 имела минимальное влияние на значения ECAR, даже когда было оказано влияние на OCR в этих клетках. В условиях гипоксии при больших значениях глюкозы обработка CoQ10 была связана с понижением повышенного ECAR до значения, которое наблюдалось в условиях нормоксии и отсутствии обработки.

Таблица 97 ECAR значения в HDFa клетках в отсутствие и присутствие

CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы

	Нормоксия (5,5 мМ)		Гипоксия (5,5 мМ)		Нормоксия (22 мМ)		Гипоксия (22 мМ)	
Обработка	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
Необработанные	5	1,32	5	0,62	5	0,62	9	0,81
50мкМ 31510	6	1,11	5	0,78	5	0,78	6	0,70
100мкМ 31510	6	0,76	5	1,19	5	1,19	8	1,07

В таблице 98 оцененные базовые значения ECAR (мрН/мин) в HASMC были выше по сравнению с HDFa. То, что условия гипоксии стали причиной повышения ECAR, скорее всего связано с тем, что внутриклеточная гипоксия вызывает ацидозы во вторую очередь после возрастания гликолиза

Таблица 98 ECAR значения в клетках HASMC в отсутствие и присутствие CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии в условиях 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы

	Нормоксия (5,5 мМ)		Гипоксия (5,5 мМ)		Нормоксия (22 мМ)		Гипоксия (22 мМ)	
Обработка	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
Необработанные	9	2,22	11	2,18	22	2,08	19	1,45
50мкМ 31510	9	2,13	11	2,54	21	1,72	17	1,60
100мкМ 31510	9	1,72	13	2,30	22	1,64	17	1,47

Наблюдалось, что обработка CoQ10 связана со спускающимся трендом степеней ECAR в гипегликемичных клетках HASMC в условиях гипоксии по сравнению со значением, которое наблюдается в условиях нормоксии при нормальной глюкозе. Эти данные показывают наличие физиологической изменчивости, которое свойственно физиологической роли определенного типа клеток, изменения наблюдаются при анормальных условиях (напр. гипергликемии), и происходит переключение на норму при воздействии CoQ10.

Напротив, раковые клетки (напр., MCF-7, PaCa-2) по сути своей склонны к культуре с более высокими уровнями глюкозы по сравнению с нормальными клетками из-за своего гликолитического фенотипа, поддерживающегося в культуре. Воздействие CoQ10 приводит к последовательному уменьшению значений OCR (фигура 39 и фигура 40).

Действие CoQ10 на значения OCR в MCF-7 и PaCa-2 клетках было подобно действию на нормальные HDFa и HASMC клетки, тогда как вариабельный ответ подтверждал терапевтическую реакцию, основанную на индивидуальном метаболитическом профиле линии раковых клеток.

Таблица 99 ECAR значения в PaCa-2 клетках в отсутствие и присутствие CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозе

	Нормоксия (17 мМ)		Гипоксия (17 мМ)		Нормоксия (22 мМ)		Гипоксия (22 мМ)	
Обработка	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
Необработанные	21	5,97	16	3,41	24	4,35	36	5,65
50мкМ 31510	13	3,08	12	1,66	20	5,15	25	4,58
100мкМ 31510	14	2,14	17	2,59	19	3,38	30	5,62

Таблица 99 описывает значения ECAR в PaCa-2 клетках. В отличие от нормальных клеток, раковые клетки фенотипически склонны использовать высокие уровни глюкозы для образования АТФ (усиленный гликолиз), что приводит к повышенному ECAR (таблица 99, ECAR для необработанной нормоксии 17 мМ) при 21 мрН/мин. Обработка CoQ10 дает значительное уменьшение степени ECAR при этих условия, скорее всего связанное с уменьшением вырабатываемой при гликолизе молочной кислоты. Связанное уменьшение OCR в этих клетках скорее всего связано с повышенной эффективностью митохондриального OXPHOS.

Подобное сравнение OCR и ECAR значений (данные не показаны), определенных для множество других нормальных и раковых клеток, включает: HAEC (нормальные эндотелиальные клетки аорты человека), MCF-7 (рак молочной железы), HepG2 (рак печени) и сильно метастазирующие PC-3 (рак

простаты) клеточные линии. Во всех этих исследуемых линиях воздействие CoQ10 в отсутствие и/или присутствие стрессоров (напр., гипергликемии, гипоксии, молочной кислоты) было связано с переключением в значениях OCR и ECAR к значениям, наблюдаемым в нормальных клетках при нормальных физиологических условиях. Таким образом, общее действие CoQ10 на лечение рака, включая клеточную гибель, является эффектом потока из-за его совместного влияния на протеомические, геномные, метаболические результаты одновременно с переключением клеточной биоэнергетики с гликолиза на митохондриальное OXPHOS.

Пример 44 **Структурные молекулярные элементы для биосинтеза CoQ10**

Этот пример демонстрирует, что определенные предшественники биосинтеза CoQ10, такие как те, которые участвуют в биосинтезе бензохинонового кольца и те, которые участвуют в биосинтезе изопроновых повторов и их присоединении к бензохиноновому кольцу, ("компоненты структурных элементов"), могут вводиться отдельно или вводиться в комбинации с целевыми клетками, и оказывать эффект отрицательной регуляции на ингибитор апоптозов Bcl-2, и/или положительной регуляции на промотор апоптозов Каспазу-3. Определенные предшественники или их комбинации могут также ингибировать клеточную пролиферацию. Данные подтверждают, что такие предшественники CoQ10 могут быть использованы вместо CoQ10 для достижения по большей части таких же результатов, как и при введении CoQ10.

Определенные приведенные в качестве примера экспериментальные условия, использованные в экспериментах, перечилены ниже.

Skmel-28 клетки меланомы культивировались в DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной бычей сыворотки (FBS) и 1X конечной концентрации антибиотиков. Клетки росли до 85% заселенности и были обработаны компонентами структурных элементов в течение 3, 6, 12 и 24 часов. Клетки затем были собраны и проведен иммуноблоттинг.

Исследуемые компоненты строительных элементов включали L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-

тирозин, 4-гидрокси-фенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидроксиманделат (манделат ванилина или VMA), ванилиновую кислоту, 4-гидроксибензоат, пироксин, пантенол, мевалоновую кислоту, Ацетилглицин, Ацетил-CoA, Фарнезил и 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон.

Для иммуноблоттинга клетки были собраны в холодный PBS, лизированы и уровни белка были количественно определены с использованием BCA белкового анализа. Общий лизат клеток был помещен в 12% Tris-HCl гель. Белки затем были перенесены на нитроцеллюлозную бумагу, а затем блокированы 5% сывороткой Tris-буферного раствора в течение 1 часа. Белки затем подвергались действию первичных антител (Bcl-2 и каспаза-3) в течение ночи. Нитроцеллюлозная бумага затем экспозировалась в Pico Chemilluminescent на 5 мин. и регистрировалась экспрессия белка. После экспозиции актин подсчитывался по такому же способу. С использованием ImageJ были подсчитаны уровни белковой экспрессии. t-Тест использовался для анализа статистической достоверности.

Иллюстративные результаты экспериментов представлены ниже.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-фенилаланина: Перед тем, как вступить в путь синтеза структуры кольца хинона, L-фенилаланин превращается в тирозин. Иммуноблоттинг был проведен для определения любых изменений вэкспрессии апоптозных белков в клетках меланомы. Тестировались следующие концентрации: 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ. В первоначальных исследованих L-фенилаланин добавлялся к DMEM/F12 среде, которая содержала его в концентрации 0,4 М. Для 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ конечная концентрация L-фенилаланина в среде была 0,405 М, 0,425 М, и 0,500 М, соответственно. Эти конечные концентрации исследовались на Skmel-28 клетках в течение периодов инкубации 3, 6, 12 и 24 часа. Клетки росли до 80% заселенности до добавления воздействующей среды и собирались с использованием процедуры иммуноблоттинга, как описано выше. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось при 100 мкМ L-фенилаланина после 3 часов и 12 часов инкубации. При 5 мкМ L-фенилаланина статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось после 6 часов инкубации. При 25 мкМ L-фенилаланина статистически достоверное снижение Bcl-2 и статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдались после 12 часов инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 показывает изменение апоптозного потенциала,

статистически достоверное возрастание каспазы-3 подтверждает, что клетки подверглись апоптозу. Имелась постоянная тенденция снижения Bcl-2 по сравнению с контролем, хотя из-за размера образцов и стандартного отклонения в этом эксперименте эти временные точки не были статистически достоверными.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов D-фенилаланина: D-фенилаланин, химически синтезированная форма биоактивного L-фенилаланина, исследовался в сравнении с L-фенилаланином. Для всех трех концентраций (5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ) D-фенилаланина наблюдалось достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 6 часов инкубации. Кроме того, для 5 мкМ и 25 мкМ, наблюдалось достоверное уменьшение после 3 часов инкубации. Для 5мкМ и 100 мкМ концентраций наблюдалось достоверное возрастание экспрессии каспазы-3 после 6 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов DL-фенилаланина: DL-фенилаланин также исследовался в сравнении с L-фенилаланином. Опять концентрации 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ исследовались на Skmel-28 клетках. Периоды инкубации составляли 3, 6, 12 и 24 часов. Статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдалось после 3 часов инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось после 24 часов инкубации. Хотя тенденция снижения Bcl-2 и возрастания каспазы-3 наблюдалась при всех концентрациях и на всех временных точках, это не было статистически достоверным в этом эксперименте.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-тирозина: L-тирозин является компонентом структурных элементов в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Первичное исследование L-тирозина не дало концентраций белка, достаточно высоких для иммуноблоттинга. В этом исследовании концентрации 25 мкМ исследовались иммуноблоттингом. В DMEM/F12 среде использовалась содержащая L-тирозин динатриевая соль в концентрации 0.398467 М. Первоначальная концентрация была увеличена до 500 nM, 5 мкМ, и 15 мкМ. Статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдалось для 500 nM концентраций после 12 часов инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось для 5 мкМ концентрации после 24 часов инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось для 500 мкМ и 5 мкМ концентраций после 24 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов D-тирозина: D-тирозин, синтетическая форма L-тирозина, исследовался в сравнении с апоптозным действием L-тирозина на клетки меланомы. Основываясь на первоначальных исследованиях L-тирозина, для иммуноблоттинга были выбраны концентрации ниже 25 мкМ. Тестируемыми концентрациями были 1 мкМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. D-тирозин показал уменьшение экспрессии Bcl-2 при 5 мкМ и 15 мкМ концентрациях на 12 и 24-часовых временных периодах. Каспаза-3 значительно возрастала при концентрациях 5 мкМ на 3, 12 и 24 временных периодах. Также наблюдалось возрастание экспрессии каспазы-3 при 1 мкМ на 12 и 24 временных периодах. Кроме того, существует возрастание экспрессии каспазы-3 при 5 мкМ на 12-часовом временном периоде.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов DL-тирозина: DL-тирозин, синтерическая форма L-тирозина, также исследовался в сравнении с апоптозным действием L-тирозина на клетки. Существует статистически достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2, наблюдаемое при 1 мкМ и 15 мкМ концентрациях после 12 часов инкубации и при 5 мкМ после 24 часов инкубации. Возрастание экспрессии каспазы-3 также наблюдалось при 5 мкМ и 15 мкМ после 12 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-гидрокси-фенилпирувата: 4-гидрокси-фенилпируват получается из аминокислот тирозина и фенилаланина и может играть роль в синтезе структуры кольца. Концентрации 1 мкМ, 5 мкМ и 15 мкМ исследовались на экспрессию Bcl-2 и каспазы-3. Для 5 мкМ и 15 мкМ концентраций наблюдается значительное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 24 часов инкубации и значительное возрастание экспрессии каспазы-3 после 12 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов фенилацетата: фенилацетат потенциально может превратиться в 4-гидроксибензоат, который играет роль в присоединении боковой цепи к структуре кольца. Тестировались следующие концентрации: 1 мкМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Для фенилацетата наблюдается уменьшение экспрессии Bcl-2 для концентраций 5 мкМ и 15 мкМ после 12 часов и 24 часов инкубации. Возрастание экспрессии каспазы-3 наблюдалось для концентраций 5 мкМ и 15 мкМ после 12 часов и 24 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 3-метокси-4-гидроксиманделат (манделат ванилина или VMA): VMA является дополнительным компонентом для синтеза структуры кольца хинона CoQ10. Тестировались следующие концентрации: 100 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ, и 100 мкМ. Хотя статистически достоверное апоптозное действие в этом эксперименте не наблюдалось, данные показывают тенденцию снижения экспрессии Bcl-2.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов ванилиновой кислоты: Ванилиновая кислота является предшественником синтеза кольца хинона и исследовалась в концентрациях 500 нМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Экспрессию Bcl-2 и каспазы-3 оценили путем иммуноблоттинга. Ванилиновая кислота показала достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 при концентрациях 500 нМ и 5 мкМ на временной точке 24 часа инкубации. Для концентрации 15 мкМ наблюдается уменьшение экспрессии Bcl-2 после 3 часов инкубации. Для клеток, инкубированных с 15 мкМ в течение 24 часов наблюдается значительное повышение экспрессии каспазы-3.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-гидроксибензоата: 4-гидроксибензойная кислота играет роль в присоединении изопреноидной боковой цепи к структуре кольца. Тестировались следующие концентрации: 500 нМ, 1 мкМ, и 50 мкМ. Наблюдалось достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 для концентраций 15 мкМ после 24 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-пиродоксина: Пиродоксин – другой предшествующий структурный элемент для синтеза структуры кольца хинона CoQ10. Для этого компонента тестировались следующие концентрации: 5мкМ, 25мкМ и 100 мкМ. Клетки оценивались по уровням Bcl-2 и каспазы-3. Пиридоксин показал значительное снижение экспрессии Bcl-2 в клетках меланомы после 24 часов инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов пантенола: Пантенол играет роль в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Концентрации, тестируемые на клетках меланомы, были следующими: 5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ. Этот компонент показал значительное снижение экспрессии Bcl-2 при 25 мкМ концентрации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов мевалона:

мевалоновая кислота является одним из основных компонентов в синтезе CoQ10. Для этого компонента тестировались следующие концентрации: 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, и 50 мкМ. В этом эксперименте не было показано достоверного уменьшения экспрессии Bcl-2 или возрастания экспрессии каспазы-3.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов ацетилглицина: Другим путем для синтеза CoQ10 является изопреноидный синтез (боковой цепи). Добавление ацетилглицина превращает Коэнзим А в Ацетил-СоА, который входит в путь мевалона для изопреноидного синтеза. Тестировались следующие концентрации 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ. Исследование ацетилглицина показало значительное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 12 часов инкубации при концентрациях 5 мкМ и 25 мкМ. Значительное уменьшение Bcl-2 было отмечено при 100 мкМ концентрации при 24 часовой временной точке инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов Ацетил-СоА: Ацетил-СоА является предшественником в мевалоновом пути в синтезе CoQ10. Тестировались следующие концентрации 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, и 50 мкМ. Не наблюдалось значительного снижения экспрессии Bcl-2 или возрастания каспазы-3 при тестируемых концентрациях и временных точках.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-Тирозина в комбинации с фарнезилом: L-тирозин является одним из предшественников в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Предыдущие эксперименты исследовали воздействие L-тирозина в среде с L-фенилаланином и L-тирозином. В этом исследовании L-тирозин изучался в среде без добавления L-фенилаланина и L-тирозина. В этом исследовании конечными тестируемыми концентрациями L-тирозина были 500 нМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Фарнезил тестировался в концентрации 50 мкМ. Не наблюдалось достоверного влияния на 3 и 6-часовых временных точках.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-фенилаланина в комбинации с фарнезилом: L-фенилаланин, предшественник синтеза структуры кольца хинона, исследовался в комбинации с фарнезилом в среде, свободной от L-тирозина и L-фенилаланина. Иммуноблоттинг был проведен для оценки экспрессии Bcl-2 и каспазы-3. Конечными концентрациями L-фенилаланина были: 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ. Фарнезил был добавлен в концентрации 50 мкМ. Это исследование показало уменьшение экспрессии Bcl-2 для большинства

тестируемых концентраций и комбинаций, как показано в таблице ниже.

L-фенилаланин	3 ч		6 ч		12 ч		24 ч	
	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3
5 мкМ	X							
5 мкМ w/ Фарнезил							X	X
25 мкМ	X		X					
25 мкМ w/ Фарнезил	X							X
100 мкМ	X		X				X	
100 мкМ w/ Фарнезил				X				

Анализ клеточной пролиферации при комбинации 4-гидроксибензоата с бензохиноном: Эта серия экспериментов использовала анализ клеточной пролиферации для определения действия комбинированных различных строительных блоков молекул на клеточную пролиферацию.

Первое исследование определяло действие комбинации 4-гидроксибензоата с бензохиноном. Клетки инкубировались 48 часов, после чего определялось число клеток для живых клеток. Каждая тестовая группа сравнивалась с контролем, и каждая комбинационная группа сравнивалась с контролем по бензохинону. Композиции статистически анализировались при добавлении бензохинона. Следующая таблица суммирует результаты подсчета клеток, где X означает статистическое уменьшение числа клеток.

4-гидрокси	По сравнению с Ctrl	По сравнению с 4-гидрокси композицией w/o бензохинона	По сравнению с контролем по бензохинону
500 нм	X		
500 нм w/ Benzo (35 мкМ)	X	X	
500 нм w/ Benzo (70 мкМ)	X	X	
1 мкМ	X		
1 мкМ w/ Benzo (35 мкМ)	X	X	
1 мкМ w/ Benzo (70 мкМ)	X	X	
50 мкМ	X		

50 мкМ w/ Benzo (35 мкМ)	X		
50 мкМ w/ Benzo (70 мкМ)	X	X	X

Существует значительное уменьшение числа клеток, инкубированных с 4-гидроксибензоатом и бензохиноном и в комбинации. Для комбинации 50 мкМ 4-гидроксибензоата в комбинации с 70 мкМ бензохинона существует значительное уменьшение числа клеток, по сравнению с контролем по бензохинону. Это подтверждает синергетичечское действие этого молярного соотношения.

Дополнительные исследования были проведены для исследования дополнительных молярных соотношений. Для первого теста 4-гидроксибензоат был тестирован в концентрации 500 нМ, 1 мкМ, и 50 мкМ. Эти концентрации тестировались в комбинации с 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохиноном (Benzo). Тестируемая концентрация Benzo составляла 25 мкМ, 50 мкМ, и 100 мкМ. Клетки меланомы росли до заселенности 80% и сажались в 6-луночные планшеты в концентрации 40K клеток на лунку. Клетки были обработаны CoQ10, 4-гидроксибензоатом, Benzo, и комбинацией 4-гидроксибензоат/бензо.

Т-тест был проведен с $p<0,05$ как статистически достоверной. X означает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

Контроль vs Benzo 25 мкМ	X
Контроль vs Benzo (B) 50 мкМ	
Контроль vs Benzo (B) 100 мкМ	X
Контроль vs 4-Гидроксибензоат (HB) Контроль нМ	X
Контроль vs HB 1 мкМ	X
Контроль vs HB 50 мкМ	X
500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 25 B	X
500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 50 B	X
500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 100 B	X
1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 25 B	X
1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 50 B	X
1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 100 B	

50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 25 B	X
50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 50 B	X
50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 100 B	
500 нМ HB w/ 25 B vs 25 B	X
500 нМ HB w/ 50 B vs 50 B	X
500 нМ HB w/ 100 B vs 100 B	X
1 мкМ HB w/ 25 B vs 25 B	X
1 мкМ HB w/ 50 B vs 50 B	X
1 мкМ HB w/ 100 B vs 100 B	
50 мкМ HB w/ 25 B vs 25 B	X
50 мкМ HB w/ 50 B vs 50 B	X
50 мкМ HB w/ 100 B vs 100 B	

Существует значительное уменьшение пролиферации клеток в среде, содержащей HB. Больше того, комбинация HB с бензохиноном показала значительное уменьшение числа клеток, сравнимое с клетками, инкубированными с соответствующими концентрациями бензохинона.

Анализ клеточной пролиферации также был сделан на клетках неонатальных фибробластов. Концентрации тестирумого HB были 500 нМ, 5 мкМ, и 25 мкМ. HB также тестировался в комбинации с бензохиноном в концентрациях 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Клетки меланомы были посажены по 40k клеток на лунку и были обработаны в течение 24 часов. Клетки были обработаны трипсином и подсчитаны с использованием счетчика.

Статистический анализ не показал значительного уменьшения клеток фибробластов. Это показывает минимальную токсичность или ее отсутствие в нормальных клетках.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации фенилацетата и бензохинона: фенилацетат является предшественником синтеза 4-гидроксибензойной кислоты (облегчает присоединение структуры кольца). Анализ клеточной пролиферации был осуществлен для определения эффекта инкубации с фенилацетатом в комбинации с CoQ10 и бензохиноном.

Контроль и 25/25 мкМ Ben	X

Контроль и 25/50 мкМ Ben	X
Контроль и 25/100 мкМ Ben	X
Контроль и 25/25 мкМ Q-10	X
Контроль и 25/25 мкМ Q-10	X
Контроль и 25/50 мкМ Q-10	X
Контроль и 25/100 мкМ Q-10	X
Контроль и Ben 25	X
Контроль и Ben 50	X
Контроль и Ben 100	X
Контроль и Q-10 25	
Контроль и Q-10 50	
Контроль и Q-10 100	X
Ben 25 мкМ и 500 нМ/25 мкМ Ben	X
Ben 25 мкМ и 5 нМ/25 мкМ Ben	X
Ben 25 мкМ и 25 нМ/25 мкМ Ben	X
Ben 50 мкМ и 500 нМ/50 мкМ Ben	X
Ben 50 мкМ и 5 нМ/50 мкМ Ben	X
Ben 50 мкМ и 25 нМ/50 мкМ Ben	X
Ben 100 мкМ и 500 нМ/100 мкМ Ben	
Ben 100 мкМ и 5 нМ/100 мкМ Ben	
Ben 100 мкМ и 25 нМ/100 мкМ Ben	
Q-10 25 мкМ и 500 нМ/25 мкМ Q-10	X
Q-10 25 мкМ и 5 нМ/25 мкМ Q-10	X
Q-10 25 мкМ и 25 нМ/25 мкМ Q-10	X
Q-10 50 мкМ и 500 нМ/50 мкМ Q-10	X
Q-10 50 мкМ и 5 нМ/50 мкМ Q-10	X
Q-10 50 мкМ и 25 нМ/50 мкМ Q-10	X
Q-10 100 мкМ и 500 нМ/100 мкМ Q-10	X
Q-10 100 мкМ и 5 нМ/100 мкМ Q-10	X
Q-10 100 мкМ и 25 нМ/100 мкМ Q-10	X

Данные показывают, что добавление фенилацетата в комбинации с

бензохиноном значительно уменьшает клеточную пролиферацию. Комбинация с CoQ10 и фенилацетатом значительно уменьшает число клеток по сравнению с инкубацией с CoQ10 одним бензохиноном.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации 4-гидроксибензоата с фарнезилом: 4-гидроксибензоат был инкубирован в комбинации с Фарнезилом. Суммарные результаты перечислены ниже. Группы 4-гидроксибензоата сравнивались с контрольными и фарнезил-контрольными группами. X означает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

4-гидроксибензоат	По сравнению с контролем	По сравнению с 4-гидрокси в совокупности с w/o фарнезилом	По сравнению с фарнезил контролем
500 нМ	X		
500 нМ w/ фарнезил (35мкМ)	X		
500 нМ w/ фарнезил (70мкМ)	X		
1 мкМ	Ошибка		
1 мкМ w/ фарнезил (35 мкМ)	Ошибка		
1 мкМ w/ фарнезил (70 мкМ)	Ошибка		
50 мкМ	X		
50 мкМ w/ фарнезил (35 мкМ)	X		
50 мкМ w/ фарнезил (70 мкМ)	X		

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-фенилаланина с бензозиноном: анализ клеточной пролиферации был проведен для тестировния комбинации L-фенилаланина в комбинации с безнохиноном. Ниже суммированы результаты по L-фенилаланину в сравнении с контролем и бензохиноновым контролем. X показывает статистически достоверное уменьшение.

L-фенилаланин	По сравнению с контролем	По сравнению с L-фенилаланином в совкупности с w/o бензохиноном	По сравнению с бензохиноновым контролем

5 мкМ			
5 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)		X	
5 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)		X	
25 мкМ			
25 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)		X	
25 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)		X	
100 мкМ			
100 мкМw/ Benzo (50 мкМ)	X	X	X
100 мкМw/ Benzo (100 мкМ)	X	X	X

Подобная синергетическая роль наблюдается для L-фенилаланина в комбинации с бензохиноном.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-фенилаланина с фарнезилом: Предварительные результаты комбинации исследований клеточной пролиферации L-фенилаланина, инкубированных в комбинации с фарнезилом. L-фенилаланин сравнивался с контрольными и фарнезил-контрольными группами. X обозначает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

L-фенилаланин	По сравнению с контролем	По сравнению с L-фенилаланином в совокупности с w/o Фарнезил	По сравнению с фарнезил контролем
5 мкМ			
5 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)			
5 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)			
25 мкМ	X		
25 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)	X	X	X
25 мкМ w/	X	X	X

Фарнезил (100 мкМ)			
100 мкМ	X		
100 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)	X		X
100 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)	X		

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-тирозина с бензозиноном: L-тирозин использовался для инкубации в комбинации с бензохиноном после чего было подсчитано число клеток. Группы сравнивались с контрольными группами и бензохиноновыми контрольными группами.

L-тирозин	По сравнению с контролем	По сравнению с L-тирозином в совокупности с w/o бензохиноном	По сравнению с бензохиноновым контролем
500 нМ			
500 нМ w/ Benzo (50 мкМ)			
500 нМ w/ Benzo (100 мкМ)			
5 мкМ	X		
5 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)	X		
5 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)	X		
15 мкМ	X		
15 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)	X		
15 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)	X		

Добавление бензохинона не амплифицирует эффект L-тирозина на число клеток.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-тирозина с бензохиноном: Это исследование исследует комбинацию L-тирозина с Фарнезилом. Группы сравнивались с контролем и Фарнезил контрольными

группами.

L-тирозин	По сравнению с контролем	По сравнению с L-тирозином в совокупности с w/o Фарнезил	По сравнению с Фарнезил контролем
500 нМ			
500 нМ w/ Фарнезил (50 мкМ)			
500 нМ w/ Фарнезил (50 мкМ)			
5 мкМ	X		
5 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)	X		
5 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)	X		
15 мкМ	X		
15 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)	X		
15 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)	X		

Комбинация L-тирозина и фарнезила не приводит к синергическому эффекту на уменьшение числа клеток в этом эксперименте.

Синтез CoQ10 разделяется на две основные части, которые состоят из синтеза структуры кольца и синтеза структуры боковой цепи. Здесь к онкогенным клеткам были добавлены вещества, которые являются предшественниками для компонентов синтеза боковой цепи и структуры кольца. Наши результаты сосредоточены на исследовании 3 основных компонентов, включенных в синтез структуры кольца, и двух компонентов, которые играют роль в присоединении структуры кольца к структуре боковой цепи. Тремя компонентами, показавшими значительное уменьшение Bcl-2 и возрастание каспазы-3 экспрессии, были: 1) L-фенилаланин, 2) L-тирозин и 3) 4-гидроксифенилпируват. Двумя компонентами, включенными в присоединение боковой цепи к структуре кольца, были: 1) 4-

гидроксибензоат и 2) фенилацетат.

Наши результаты также показали, что экзогенная доставка этих компонентов в комбинации с 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохиноном (бензохинон) значительно ингибирует пролиферацию клеток. Это показывает, что добавка структуры кольца с компонентами для присоединения боковой цепи к бензохиноновму кольцу может дополнительно усилить механизм синтеза CoQ10. Это может также содействовать стабилизации молекулы в поддержании функциональных свойств, необходимых для клеточных процессов. Фенилацетат, являющийся предшественником синтеза 4-гидроксибензоата, который экзогенно доставляется в комбинации с бензохиноном имеет подобное влияние на онкогенные клетки.

Пример 45 Модуляция генной экспрессии коэнзимом Q10 в клеточной модели диабета

Коэнзим Q10 является эндогенной молекулой с устоявшейся ролью в поддержании нормальной митохондриальной фукнции, прямо влияя на окислительное фосфорилирование. Существует экспериментальное доказательство, которое демонстрирует способность коэнзима Q10 модулировать внутриклеточные цели, которые служат ключевыми показателями метаболических расстройств, таких как диабеты, таким образом достигая терапевтического эффекта.

Для того чтобы понять, как коэнзим Q10 регулирует экспрессию генов, связанных с причиной или лечением диабета, в качестве экспериментальной модели были использованы иммортальная первичная линия клеток проксимальных канальцев почек, произошедшая из почки человека (HK-2) и первичные культуры гладких мускульных клеток аорты человека (HASMC). The HK-2 и HASMC клетки нормально поддерживаются в культуре с 5,5 мМ глюкозы, которая является концентрацией, связанной с диапазоном, считающимся нормальным для крови человека. Однако для того чтобы симулировать диабетическое окружение, обе клеточные линии впоследствии содержались при 22 мМ глюкозы, что соответствует значениям, наблюдаемым в крови человека, связанным с хронической гипергликемией. Клетки впоследствии дали размножаться через 3 перехода, так что во внутриклеточных регуляционных

процессах МВМ функционально адаптировались к диабетическому состоянию. Выбор клеточной линии основывался на физиологическом влиянии диабета на почечную дисфункцию и прогрессию абсолютной почечной недостаточности (ESRD) в добавление к прогрессивной патофизиологии подорванной кардиоваскулярной функции.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в НК-2 клетках с использованием диабетического ПЦР анализа

Диабетический ПЦР анализ (SABiosciences) применяется для скринирования 84 генов одновременно. В этом исследовании тестировались следующее 4 обработки:

- НК-2;
- НК-2 Н содержавшаяся при 22 мМ глюкозы;
- НК2(Н) +50 мкМ коэнзима Q10; и
- НК2(Н) + 100 мкМ коэнзима Q10.

Точный анализ данных ПЦР в режиме реального времени НК-2 образцов по диабетическому анализу (Cat # PAHS-023E, SABiosciences Frederick, Мэриленд) был сделан для того чтобы исключить все результаты, где регуляция генов менее чем в два раза по сравнению с нормальными необработанными НК-2 клетками с значением *p* менее чем 0,05. Гены, для которых наблюдалось, что они регулируются или хронической гипергликемией, или коэнзимом Q10, перечислены в таблице 100 и их функции и внутриклеточная локация (взятые из Ingenuity Pathway Analysis) перечислены в таблице 101.

Таблица 100

Гены	**НК-2(Н) Кратность регуляции**	**значение p**	**НК-2(Н)-50 мкМ Коэнзим Q10 кратность регуляции**	**значение p**	**НК-2(Н)-100 мкМ Коэнзим Q10 Кратность регуляции**	**значение p**
CEACAM1	1,26	0,409	3,47	0,067	5,36	0,032
PIK3C2B	1,48	0,131	2,32	0,115	3,31	0,003
INSR	-1,09	0,568	2,51	0,103	2,88	0,024
TNF	2,00	0,005	2,57	0,042	2,81	0,020

ENPP1	-1,50	0,002	1,42	0,238	2,67	0,038
PRKCB	-1,75	0,005	1,82	0,280	2,49	0,042
DUSP4	1,27	0,318	1,24	0,455	2,26	0,060
SELL	-1,58	0,219	1,77	0,042	2,06	0,021
SNAP25	-1,00	0,934	1,46	0,377	1,97	0,059

Таблица 101

Обозначение	**Entrez название гена**	**Локализация**	**Тип(ы)**
CEACAM1	Молекула клеточной адгезии 1, связанная с карциоэмбриональным антигеном (билиарный гликопротеин)	Плазматическая мембрана	трансмембранный рецептор
PIK3C2B	фосфоинозитид-3-киназа, класс 2, бета полипептид	Цитоплазма	Киназа
INSR	Инсулировый рецептор	Плазматическая мембрана	Киназа
TNF	Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)	Внеклеточное пространство	Цитокин
ENPP1	Эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1	Плазматическая мембрана	Фермент
PRKCB	Протеинкиназа С, бета	Цитоплазма	Киназа
DUSP4	Двойная специфичная фосфатаза 4	Ядро	Фосфатаза
SELL	Селектин L	Плазматическая мембрана	Другое
SNAP25	Синаптосома-ассоциированный белок, 25кДа	Плазматическая мембрана	Транспортер

Среди детектируемых РНК транскриптов с модулированными уровнями, ракового эмбрионального антигена молекула клеточной адгезии 1 (CEACAM1)

была идентифицирована как высоко положительно регулируемая в HK2(H) клетках, особенно обработкой 100 мкМ коэнзима Q10. CEACAM-1, также известный как CD66a и BGP-I, является 115-200 KD типом I трансмембранного гликопротеина, который принадлежит к субсемейству мембран-связанных CEA из суперсемейства CEA. На поверхности клеток он формирует нековалентные гомо- и гетеродимеры. Внеклеточный регион содержит три C2-типа Ig-подобных доменов и один N-терминальный V-тип Ig-подобного домена. Существуют множественные сплайс-вариации, включающие регионы C-терминальные для второго C2-типа домена (аа 320 и далее). Предполагается, что отсутствие интактной экспрессии CEACAM1 у мышей усиливает метаболический синдром, связанный с диабетами, тогда как возрастание экспрессии CEACAM1 связывается с возрастающей инсулиновой интернализацией, которая подтверждает возрастание инсулиновой чувствительности и утилизации глюкозы (напр., движения глюкозы из крови в клетки), таким образом смягчая резистентность к инсулину, отличительный признак сахарного диабета 2 типа.

Как показано в таблице 100, экспрессия инсулирового рецептора (INSR) также меняется в диабетических HK-2 клетках, обработанных коэнзимом Q10. Не имея стремления ограничиваться теорией, возрастание экспрессии INSR при обработке коэнзимом Q10 должно усилить чувствительность к инсулину (или одного, или в совокупности с экспрессией CEACAM1) с возможностью развернуть основные физиологические/метаболические трудности, связанные с диабетом.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HK-2 клетках с использованием митохондриального анализа

Дифференциальная экспрессия митохондриальных генов при диабете оценивалась с использованием митохондриальных анализов (Cat# PAHS 087E, SABisociences Frederick, Мэриленд). Гены, которые регулируются хронической гипергликемией и /или воздействием коэнзима Q10, перечислены в таблице 102, а их функции и локализация перечислены в таблице 103.

Таблица 102

Гены	**HK2 (H) необработа**	**p значение**	**HK-2(H) 50 мкМ**	**p значение**	**HK-2(H) 100 мкМ Коэнзима**	**p значение**

	нный		Коэнзима Q10		Q10	
GRPEL1	-1,5837	0,151255	-2,6512	0,04704	-1,933	0,139161
SLC25A3	-8,6338	0,071951	-8,2059	0,0425	-1,6984	0,995194
TOMM40	-2,3134	0,140033	-1,1567	0,115407	-1,9509	0,038762
TSPO	-3,6385	0,111056	-6,7583	0,073769	-2,1104	0,167084

Таблица 103

Обозначение	Entrez Название гена	Локализация	Тип(ы)
GRPEL1	GrpE-подобный 1, митохондриальный (E. coli)	Митохондрия	Другое
SLC25A3	Растворимых переносчиков семейство 25 (митохондриальный переносчик; фосфата переносчик), член 3	Митохондриальная мембрана.	Транспортер
TOMM40	Транслоказа внешнего митохондриального мембранного 40 гомолога(дрожжи)	Внешняя мембрана митохондрии.	Ионный канал
TSPO	Транслокаторный белок (18кДа)	Внешняя мембрана митохондрии.	Трансмембранный рецептор

На сегодняшни день, роль четырех митохондриальных генов, идентифицированных (таблица 102) в диабетических НК-2 клетках, обработанных коэнзимом Q10, не охарактеризована в диабете.

Исследование 2: Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HASMC клетках с использованием диабетического ПЦР анализа

Диабетический ПЦР анализ (SABiosciences) позволяет скринировать одновременно 84 гена. 4 обработками, тестированными в этом исследовании, были:

- HASMC;
- HASMC H, содержавшиеся в 22 мМ глюкозы;
- HASMC (H) + 50 мкМ коэнзима Q10; и
- HASMC (H) + 100 мкМ коэнзима Q10.

Точный анализ данных ПЦР в режиме реального времени HASMC образцов по диабетическому анализу (Cat # PAHS-023E, SABiosciences Frederick,

Мэриленд) был сделан для того, чтобы исключить все результаты, где регуляция генов менее чем в два раза по сравнению с нормальными необработанными HASMC клетками с значением *p* менее чем 0,05. Гены, для которых наблюдалось, что они регулируются или хронической гипергликемией, и/или коэнзимом Q10, перечислены в таблице 104.

Таблица 104

Гены	**HASMC-(H)**	**значение p**	**HASMC-(H)-50 мкМ коэнзима Q10**	**значение p**	**HASMC-(H)-100 мкМ коэнзима Q10**	**значение p**
AGT	1,3051	0,547507	-1,0169	0,781622	2,3027	0,030195
CCL5	-17,4179	0,013798	-5,3796	0,022489	-4,6913	0,022696
CEACAM1	-5,5629	0,012985	-5,3424	0,014436	-5,8025	0,012948
IL6	2,7085	0,049263	3,8172	0,012685	6,0349	0,000775
INSR	1,4649	0,207788	1,9622	0,081204	2,0801	0,016316
NFKB1	1,482	0,072924	1,3779	0,191191	2,0898	0,027694
PIK3C2B	2,0479	0,218276	1,4331	0,254894	2,6329	0,069422
SELL	-1,9308	0,087513	1,2476	0,393904	4,0371	0,000177
TNF	-1,814	0,108322	-3,2434	0,043526	-1,8489	0,133757

В клетках HASMC, обработка гипергликемичных клеток коэнзимом Q10 привела к изменению экспрессии в генах, включенных в регуляцию васкулярной фукнции (AGT), чувствительности к инсулину (CEACAM1, INSR, SELL) и воспалительной/иммунной функции (IL-6, TNF, CCL5). Не имея стремления ограничиваться теорией, возрастание экспрессии INSR может быть связано с возрастанием инсулиновой чувствительности в HASMC клетках, которая является физиологическим свойством, которое благоприятно для лечения диабета, тогда как IL-6, в дополнение к своим иммунорегулирующим свойствам, как преполагается, действует на гомеостаз и метаболизм глюкозы, как прямо, так и опосредованно, путем действия на скелетные мышечные клетки, адипоциты, гепаоциты, панкреатические β-клетки и нейроэндокринные клетки. Перед активацией нормальная Т-клетка экспрессирует и секретирует RANTES и хемокиновый (C-Cmotif) лиганд (CCL5). CCL5 экспрессируется адипоцитами, и

уровни RANTES в сыворотке возрастают при ожирении и диабете 2 типа. Однако, как показано в таблице 104, обработка HASMC клеток коэнзимом Q10 приводит к значительному уменьшению экспрессии CCL5. Основываясь на вышеизложенных данных, мы надеемся, что введение коэнзима Q10 будет давать терапевтическую пользу в лечении диабета.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HASMC клетках с использованием митохондриального анализа

Различная экспрессия митохондриальных генов была исследована с использованием митохондриального анализа (Cat# PAHS 087E, SABisociences Frederick, Мэриленд). Гены, которые регулируются или хронической гипергликемией, и/или коэнзимом Q10, показаны в таблице 105.

Таблица 105

Гены	**HASMC-(H)**	**значение p**	**HASMC-(H) 50 мкМ коэнзима Q10**	**значение p**	**HASMC-(H)-100 мкМ коэнзима Q10**	**значение p**
BCL2L1	-1,6558	0,244494	-2,7863	0,008744	-2,3001	0,014537
MFN1	-1,4992	0,317009	-1,2585	0,021185	-2,2632	0,005961
PMAIP1	-4,7816	0,206848	-6,8132	0,000158	-4,352	0,000286
SLC25A1	-2,2051	0,020868	-1,834	0,00581	-3,0001	0,03285
SLC25A13	-2,0527	0,035987	-1,5	0,029019	-1,5245	0,043712
SLC25A19	-1,0699	0,417217	-1,4257	0,104814	-2,1214	0,007737
SLC25A22	-2,1747	0,007344	-1,9839	0,0013	-10,3747	0,003437
TIMM44	-1,3605	0,414909	-2,3214	0,004118	-1,9931	0,010206
TOMM40	-1,1982	0,428061	-2,0922	0,002195	-2,2684	0,003272
TSPO	-1,402	0,304875	-2,0586	0,061365	-2,3647	0,044656

Обработка гипергликемичных HASMC клеток коэнзимом Q10 привела к изменению экспрссии в генах, которые регулируют программируемую клеточную гибель или апоптоз (BCL2L1, PMIAP1 также известный как NOXA), белки транспортеры (SLC25A1 [транспортер цитрата], SLC25A13 [антипортер аспартата-

глутамата], SLC25A19 [транспортер тиамин пирофосфата] и SLC25A22 [глутамат-гидроген котранспортер]) и белки транспорта в митохондриальном матриксе (MFN1, TIMM44 и TOMM40). Активность этих транспортеров играет важную роль в регуляции предшественников, необходимых для цикла Кребса и поддержания митохондриального окислительного фосфорилирования. Эти результаты показывают, что воздействие на диабетические клетки HASMC коэнзимом Q10 связано с изменениями в экспрессии цитоплазматических и митохондриальных генов, что в свою очередь согласуется с тем, что коэнзим Q10 предоставляет терапевтическую пользу в лечении диабета.

Сравнение с данными, наблюдаемыми при воздействии на HASMC клетки и HK-2 клетки коэнзимом Q10 или в гипергликемическом окружении, показывает, что 4 гена обычно регулируются коэнзимом Q10 в обеих клеточных линиях (*напр.*, PIK3C2B и SELL в анализе генной экспрессии и TOMM40 и TSPO в митохондриальном анализе). Эти результаты демонстрируют, что воздействие на клетки в диабетическом состоянии коэнзимом Q10 связано с изменением экспрессии генов, про которых известно, что они связаны с причиной или лечением диабета.

ПРИМЕР 46 ***In vivo*** **действие введения коэнзима Q10 на рак поджелудочной железы**

Внутривенное введение формулы с коэнзимом Q10 было оценено для лечения рака поджелудочной железы в модели на животных. Крысы с индуцированным раком поджелудочной железы были рандомально разделены на группы и получали одну из следующих 9 обработок:

- Группа A: контроль
- Группа B: солевой раствор
- Группа C: носитель
- Группа D: 5 мг/кг коэнзима Q10
- Группа E: 10 мг/кг коэнзима Q10
- Группа F: 25 мг/кг коэнзима Q10
- Группа G: 50 мг/кг коэнзима Q10

- Группа H: 5 мг/кг доксорубицина
- Группа I: 50 мг/кг коэнзима Q10 и 5 мг/кг доксорубицина

После 28 дней все животные в группах Groups A и B и большинство животных из группы C умерли. Напротив, большинство животных из групп D, E и F остались жить, и те животные, которые получали более высокие дозы коэнзима Q10, оставались в живых дольше. Более того, все животные, получавшие наиболее высокую дозу коэнзима Q10 (группа G), оставались живыми 28 дней. Эти данные показывают полную дозозависимую кривую, в которой животные, получающие более высокие дозы, имеют более высокий показатель выживаемости.

Чтобы оценить эффективность коэнзима Q10 в лечении рака поджелудочной железы в комбинации с доксорубицином, группе H вводился один доксорубицин, тогда как группе I вводилась комбинация доксорубицина и коэнзима Q10. После 28 дней значительное число животных в группе H умерло вследствие токсичности доксорубицина, тогда как у животных из группы I показатель выживаемости был выше. Эти данные подтверждают, что, в дополнение к повышению выживаемости, связанной с раком поджелудочной железы, коэнзим Q10 может также смягчать токсические побочные эффекты химиотерапии.

Эквиваленты:

Специалисты в данной области распознают, или будут способны распознать, используя лишь обычные эксперименты, многие эквиваленты определенным воплощениям и способам, описанным в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты полностью включены в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, облегчения симптомов, предотвращения прогрессирования или профилактики онкологических заболеваний у млекопитающих, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фактор влияния (фактор-в), избирательно вызывающий, в раковых клетках млекопитающих, переключение клеточного энергетического метаболизма с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование, к уровням, наблюдаемым в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния по большей части не вызывает, в нераковых клетках млекопитающих, переключения клеточного энергетического метаболизма с гликолиза на митохондриальное окислительное фосфорилирование.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что млекопитающим является человек (или не являющееся человеком млекопитающее).

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактором влияния не является коэнзим Q10, или его метаболиты или аналоги, включая аналоги, не имеющие или имеющие, по меньшей мере, один изопрениловый повтор.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что онкологическое заболевание реагирует или чувствительно к лечению коэнзимом Q10 или его метаболитами или аналогами.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния запускает апоптоз или механизм клеточной гибели в раковых клетках.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния ингибирует ангиогенез в раковых клетках.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния вызывает модуляцию связанных с иммунитетом элементов в микросреде раковых клеток.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния вызывает изменения в контроле клеточного цикла в раковых клетках.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния включает:

    (a) бензохинон или, по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, и

(b) по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что вышеупомянутая, по меньшей мере, одна молекула, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, включает в себя: L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-тирозин, 4-гидрокси-фенилпируват, 3-метокси-4-гидроксиманделат (ванилил-миндальная кислота или VMA), ванилиновую кислоту, пиридоксин или пантенол.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что вышеупомянутая, по меньшей мере, одна молекула, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу, включает в себя: фенилацетат, 4-гидроксибензоат, мевалоновую кислоту, ацетилглицин, ацетил-CoA или фарнезил.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния включает:

(a) один или несколько из L-фенилаланина, L-тирозина и 4-гидроксифенилпирувата; и,

(b) один или несколько из 4-гидроксибензоата, фенилацетата и бензохинона.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния :

(a) ингибирует экспрессию Bcl-2 и/или стимулирует экспрессию каспазы-3; и/или,

(b) ингибирует клеточную пролиферацию.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния является многоаспектной внутриклеточной молекулой (MBM).

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что MBM выбирают из: альфа кетоглутарата/альфакетоглутаровой кислоты, малата/яблочной кислоты, сукцината/янтарной кислоты, глюкозамина, аденозина, аденозин дифосфата, глюкуронида/глюкуроновой кислоты, никотиновой кислоты, динуклеотида никотиновой кислоты, аланина/фенилаланина, пиридоксина, тиамина или флавинадениндинуклеотида.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фактор влияния является эпиметаболическим переключателем.

18. Способ по п. 17, где эпиметаболический переключатель выбирают из: трансальдолазы, транскетолазы, сукцинил CoA синтазы, пируваткарбоксилазы или рибофлавина.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество вышеупомянутого, по меньшей мере, одного фактора влиния отрицательно регулирует анаэробное использование глюкозы и положительно регулирует митохондриальное окислительное фосфорилирование.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что форма фактора влияния, вводимого человеку, отличается от преобладающей формы, находимой в системе кровотока у человека.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из: лейкемии, лимфомы, меланомы, карциномы и саркомы.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что включает также введение млекопитающему дополнительного терапевтического агента или терапевтического режима.

23. Способ избирательного блокирования в раковых клетках млекопитающих, нуждающихся в лечении онкологического заболевания, анаэробного использования глюкозы (гликолиза) и усиления митохондриального окислительного фосфорилирования, включающий введение вышеупомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного фактора-в для избирательного блокирования анаэробного использования глюкозы и для усиления митохондриального окислительного фосфорилирования в вышеупомянутых раковых клетках млекопитающих, по сравнению с уровнями, наблюдаемыми в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что дополнительно включает:

(1) положительную регуляцию экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из генов, перечисленных в таблицах 2-4 и 6-28, имеющих позитивное кратное изменение; и/или,

(2) отрицательную регуляцию экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из генов, перечисленных в таблицах 2-4 и 6-28, имеющих негативное кратное изменение.

25. Способ по п. 23, отличающийся тем, что дополнительно включает модулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, вкючающей HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11, XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансальдолазу 1, COQ1, COQ3, COQ6, фенилтрансферазу, 4-гидробензоат, нейтрофильный цитоплазматический фактор 2, синтазу оксида азота 2A, супероксиддисмутазу 2, VDAC, Bax канал, ANT, цитохром c, комплекс 1,

комплекс II, комплекс III, комплекс IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam киназу II.

26. Способ по любому из пп. 23-25, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбирают из группы, включающей: лейкемию, лимфому, меланому, карциному и саркому.

27. Способ по любому из пп. 23-25, отличающийся тем, что дополнительно включает режим лечения, выбранный из группы, включающей хирургию, радиацию, гормональную терапию, терапию антителами, терапию факторами роста, цитокинами, и химиотерапию.

28. Способ идентификации эффективного фактора влияния для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования или предотвращения онкологических заболеваний у млекопитающих, включающий:

(1) получение болезненного биологического образца, содержащего в себе раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток;

(2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния;

(3) определение уровня экспрессии одного или более маркеров, представленных в болезненном и нормальном биологических образцах, где маркер выбирается из группы, состоящей из маркеров, перечисленных в таблицах 2-4 и 6-28, имеющих позитивное кратное изменение и/или негативное кратное изменение;

(4) сравнение уровня экспрессии одного или более маркеров в болезненном и нормальном биологических образцах;

где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который увеличивает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих позитивное кратное изменение и/или снижает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих негативное кратное изменение, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце.

29. Способ лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования или предотвращения онкологических заболеваний у млекопитающих, включающий:

(1) получение болезненного биологического образца, содержащего в себе раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток;

(2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния;

(3) определение уровня экспрессии одного или более маркеров, представленных в болезненном и нормальном биологических образцах, где маркер выбирается из группы, состоящей из маркеров, перечисленных в таблицах 1-28, имеющих позитивное кратное изменение и/или негативное кратное изменение;

(4) сравнение уровня экспрессии одного или более маркеров в болезненном и нормальном биологических образцах; где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который увеличивает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих позитивное кратное изменение и/или снижает уровень экспрессии одного или более маркеров, имеющих негативное кратное изменение, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце;

(5) введение млекопитающему эффективного фактора влияния;

посредством чего лечится онкологическое заболевание у млекопитающих.

30. Способ идентификации эффективного фактора влияния для лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования или предотвращения онкологических заболеваний у млекопитающих, включающий:

(1) получение болезненного биологического образца, содержащего в себе раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток;

(2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния;

(3) определение уровня гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования в болезненном и нормальном биологических образцах, до и после контакта с потенциальным фактором влияния;

где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который повышает уровень митохондриального окислительного фосфорилирования и/или уменьшает уровень гликолиза, в болезненном

биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце.

31. Способ лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессирования или предотвращения онкологических заболеваний у млекопитающих, включающий:

(1) получение болезненного биологического образца, содержащего в себе раковые клетки онкологического заболевания, и нормального биологического образца, не содержащего раковых клеток;

(2) контакт болезненных и нормальных биологических образцов с потенциальным фактором влияния;

(3) определение уровня гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования в болезненном и нормальном биологических образцах, до и после контакта с потенциальным фактором влияния, где эффективный фактор влияния идентифицируется как потенциальный фактор влияния, который повышает уровень митохондриального окислительного фосфорилирования и/или уменьшает уровень гликолиза, в болезненном биологическом образце, но по большей части не в нормальном биологическом образце; и

(4) введение млекопитающему эффективного фактора влияния; посредством чего лечится онкологическое заболевание у млекопитающих.

32. Способ по п. 30 или 31, отличающийся тем, что уровень гликолиза оценивают как ECAR, и/или где уровень митохондриального окислительного фосфорилирования оценивают как OCR.

33. Способ по п. 23, отличающийся тем, что фактор влияния не является коэнзимом Q10.

34. Способ идентификации многоаспектной внутриклеточной молекулы, включающий:

(1) контакт клетки с эндогенной молекулой;

(2) мониторинг действия эндогенной молекулы на профиль клеточного микроокружения; и

(3) идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает изменение в профиле клеточной микросреды;

таким образом идентифицируется многоаспектная внутриклеточная молекула.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что дополнительно включает:

(1) сравнение действия эндогенной молекулы на профиль клеточного микроокружения больной клетки и нормальной контрольной клетки; и

(2) идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает различные изменения в профиле клеточной микросреды больной клетки и нормальной контрольной клетки.

36. Способ по п. 34 или 35, отличающийся тем, что действие на профиль клеточного микроокружения определяют путем оценки изменения уровня или активности клеточной молекулы, выбранной из группы, вкючающей мРНК, белки, липиды и метаболиты.

37. Способ идентификации эпиметаболического переключателя, включающий:

(1) сравнение молекулярных профилей двух или более клеток или тканей, где две или более клеток или тканей находятся на различных стадиях заболевания;

(2) идентификация молекулы из молекулярных профилей, для которых изменение в уровне коррелирует со стадией заболевания;

(3) введение молекулы в клетку; и

(4) оценка возможности молекулы переключить метаболический статус клетки;

где молекула, способная переключить метаболический статус клетки, идентифицируется как эпиметаболический переключатель.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что молекулярный профиль выбирают из группы, включающий профиль метаболитов, профиль липидов, профиль белков или профиль РНК.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что молекула не оказывает негативного воздействия на здоровье или рост нормальных клеток.

40. Способ идентификации агента, эффективного для лечения онкологического заболевания, включающий:

(1) предоставление потенциального фактора влияния;

(2) определение способности фактора влияния переключать метаболический статус клетки; и

(3) определение того, является ли потенциальный фактор влияния эффективным для лечения онкологического заболевания;

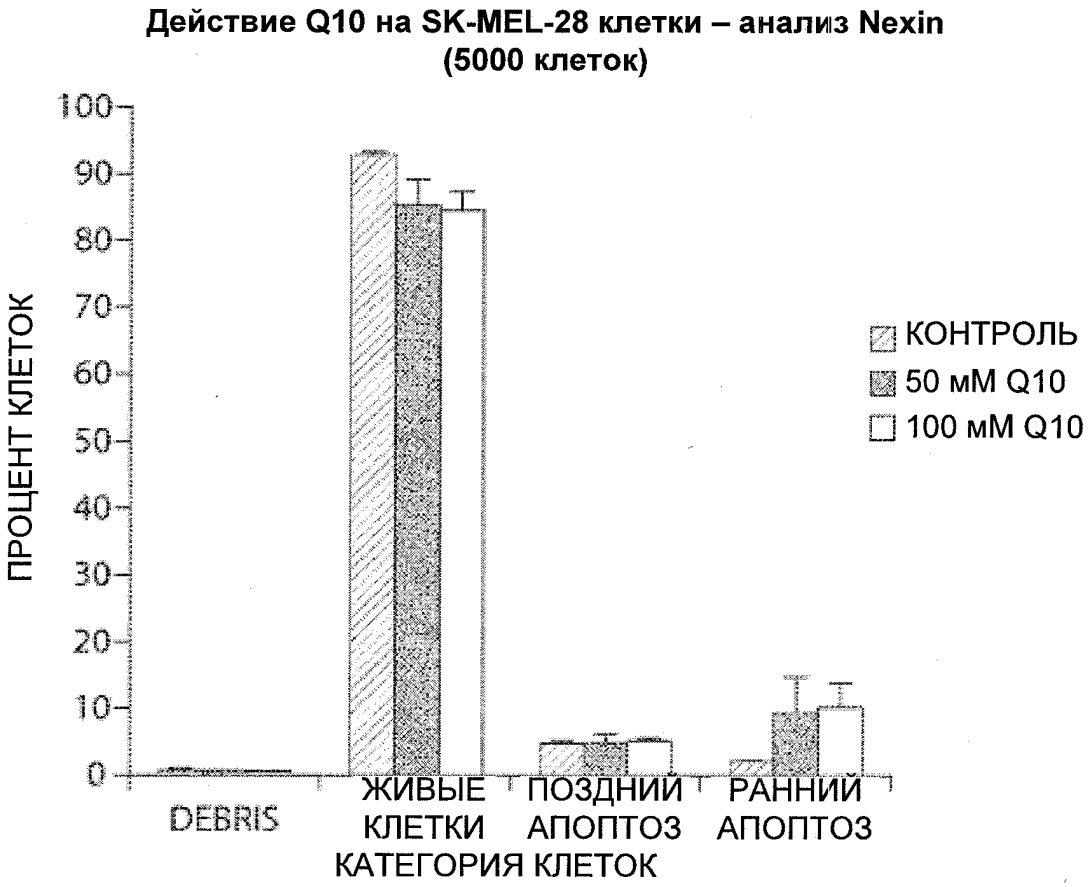
где потенциальный фактор влияния, способный переключать метаболический статус клетки и эффективный для лечения онкологического заболевания идентифицируется как агент, эффективный для лечения онкологического заболевания.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что переключение в метаболическом статусе клетки определяется путем оценки изменений экспрессии одной или более мРНК, уровней липидов, уровней метаболитов, уровней биоэнергетических молекул, клеточной энергетики, функции митохондрий и числа митохондрий.

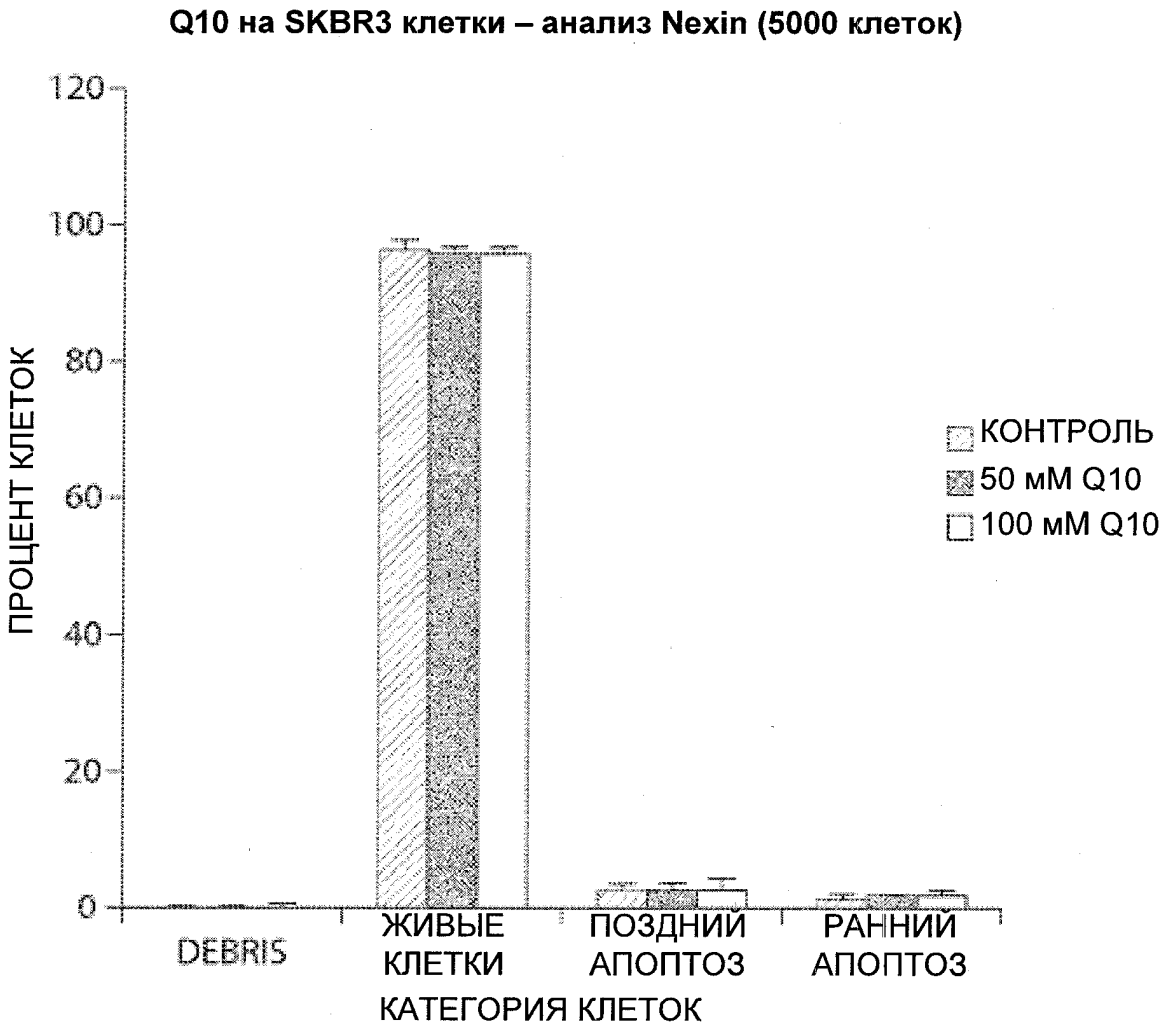
42. Композиция, содержащая агент, идентифицированный согласно способу по любому из пп. 34-41.

43. Способ для лечения, облегчения симптомов, предотвращения прогрессирования или предупреждения поддающегося действию CoQ10 заболевания у млекопитающих, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества фармакологической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает в больных клетках млекопитающего, переключение клеточного энергетического метаболизма уровней гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования на наблюдаемые в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях.

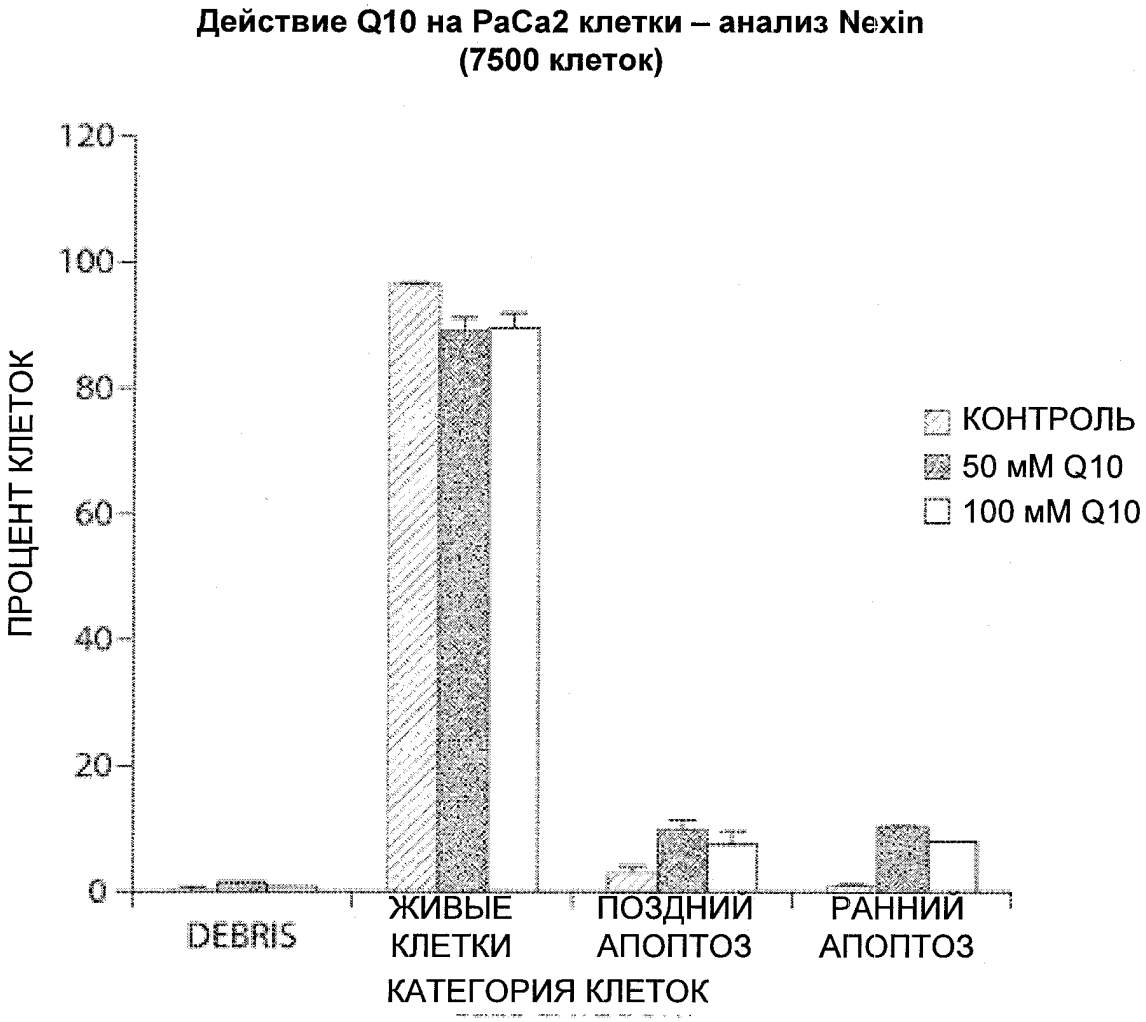
44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что поддающееся действию CoQ10 заболевание является онкологическим заболеванием.


Действие Q10 на SK-MEL-28 клетки – анализ Nexin
(5000 клеток)
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
100 мМ Q10

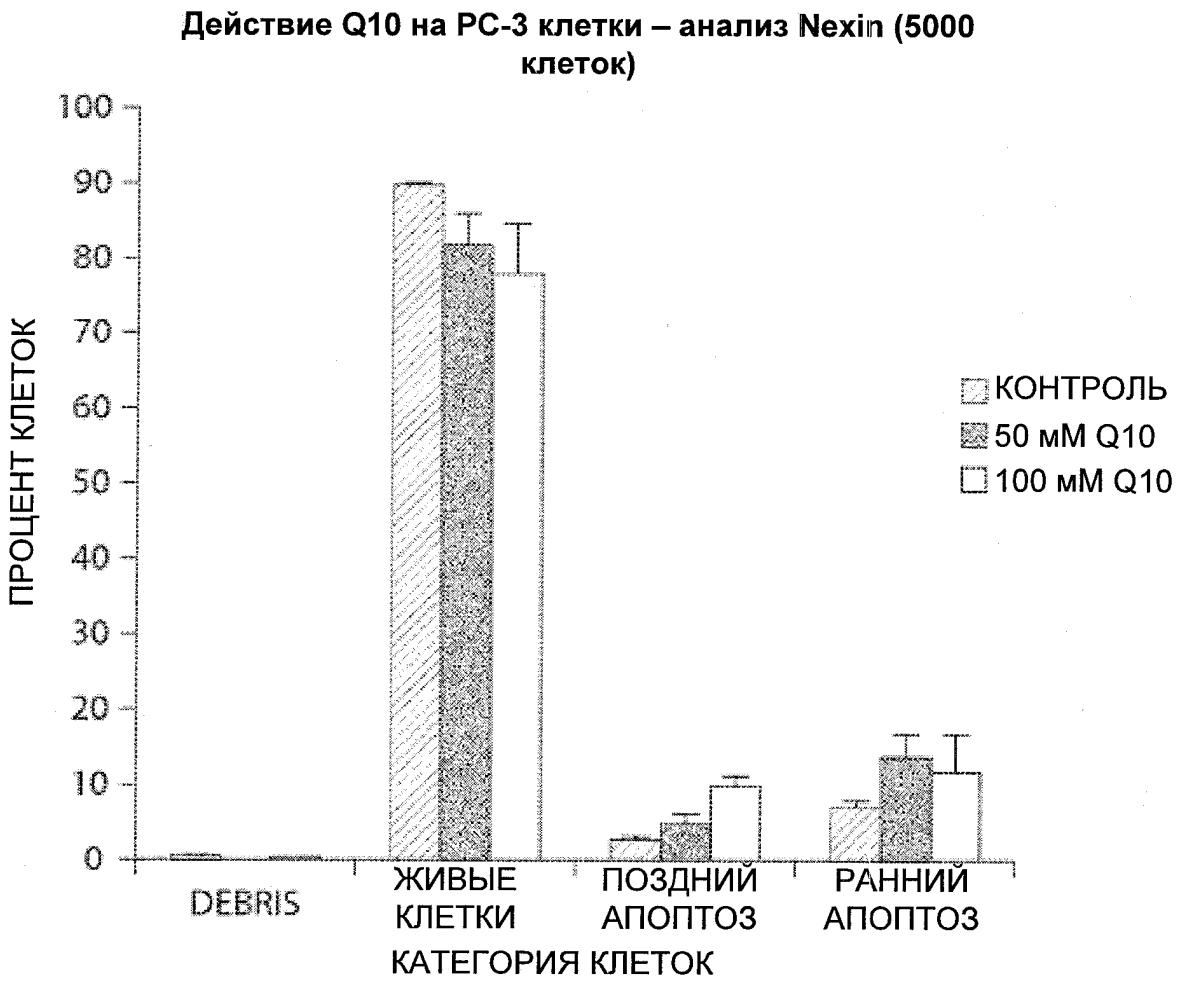
ФИГ. 1


Q10 на SKBR3 клетки – анализ Nexin (5000 клеток)
120
100
80
60
40
20
0
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
100 мМ Q10
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК

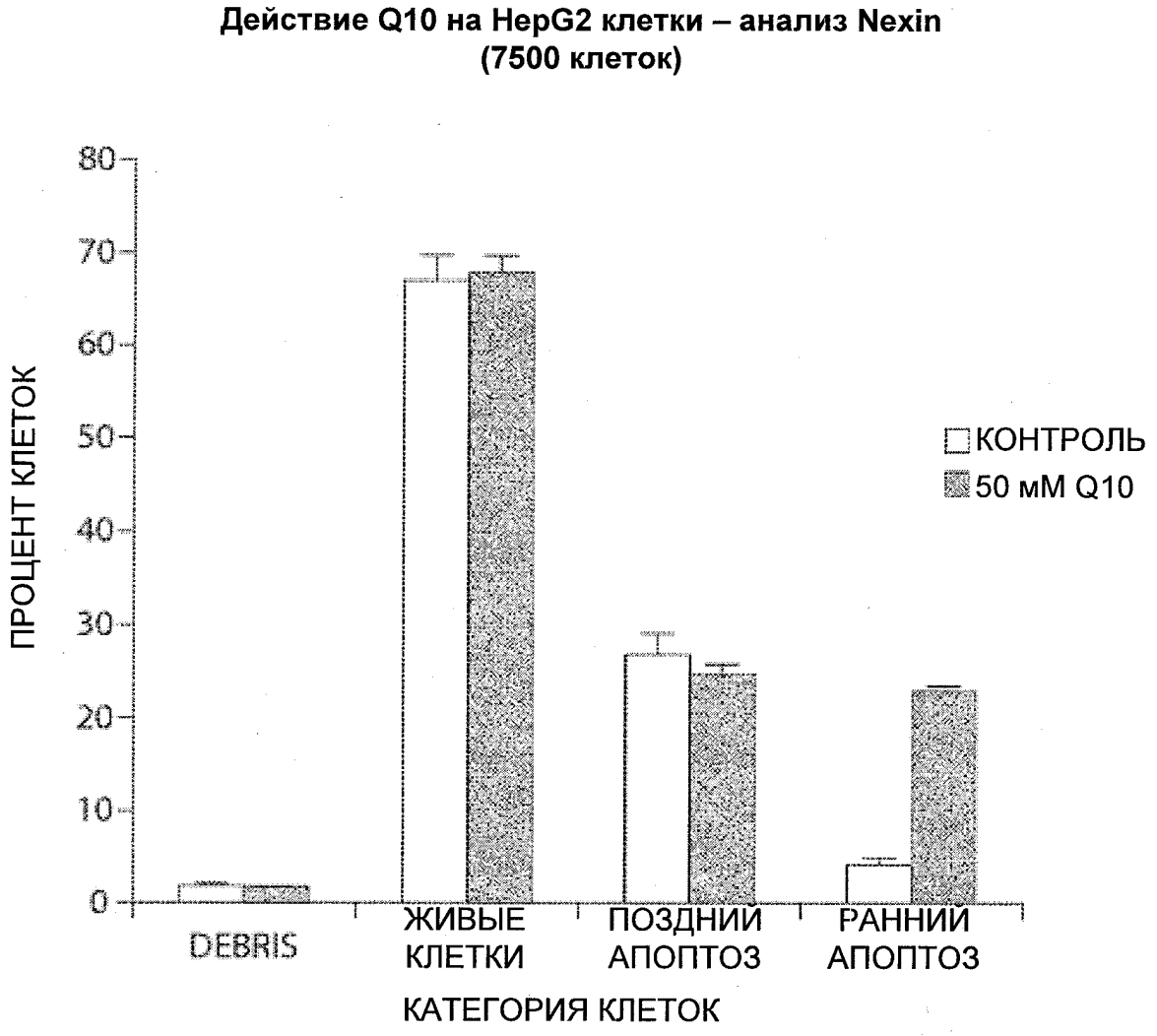
ФИГ. 2


Действие Q10 на PaCa2 клетки – анализ Nexin
(7500 клеток)
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
120
100
80
60
40
20
0
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
100 мМ Q10
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК

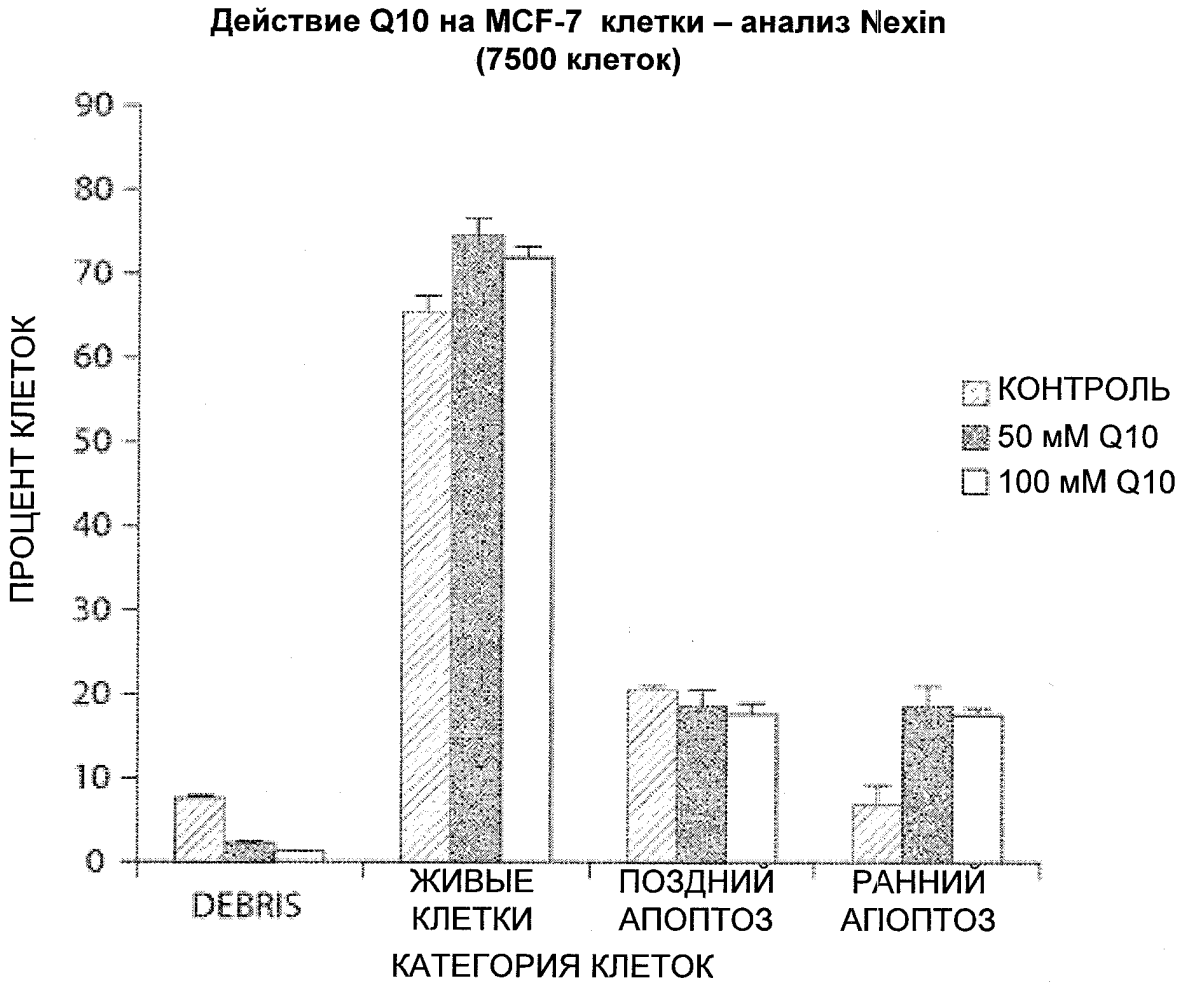
ФИГ. 3


Действие Q10 на PC-3 клетки – анализ Nexin (5000 клеток)
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
100 мМ Q10
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК

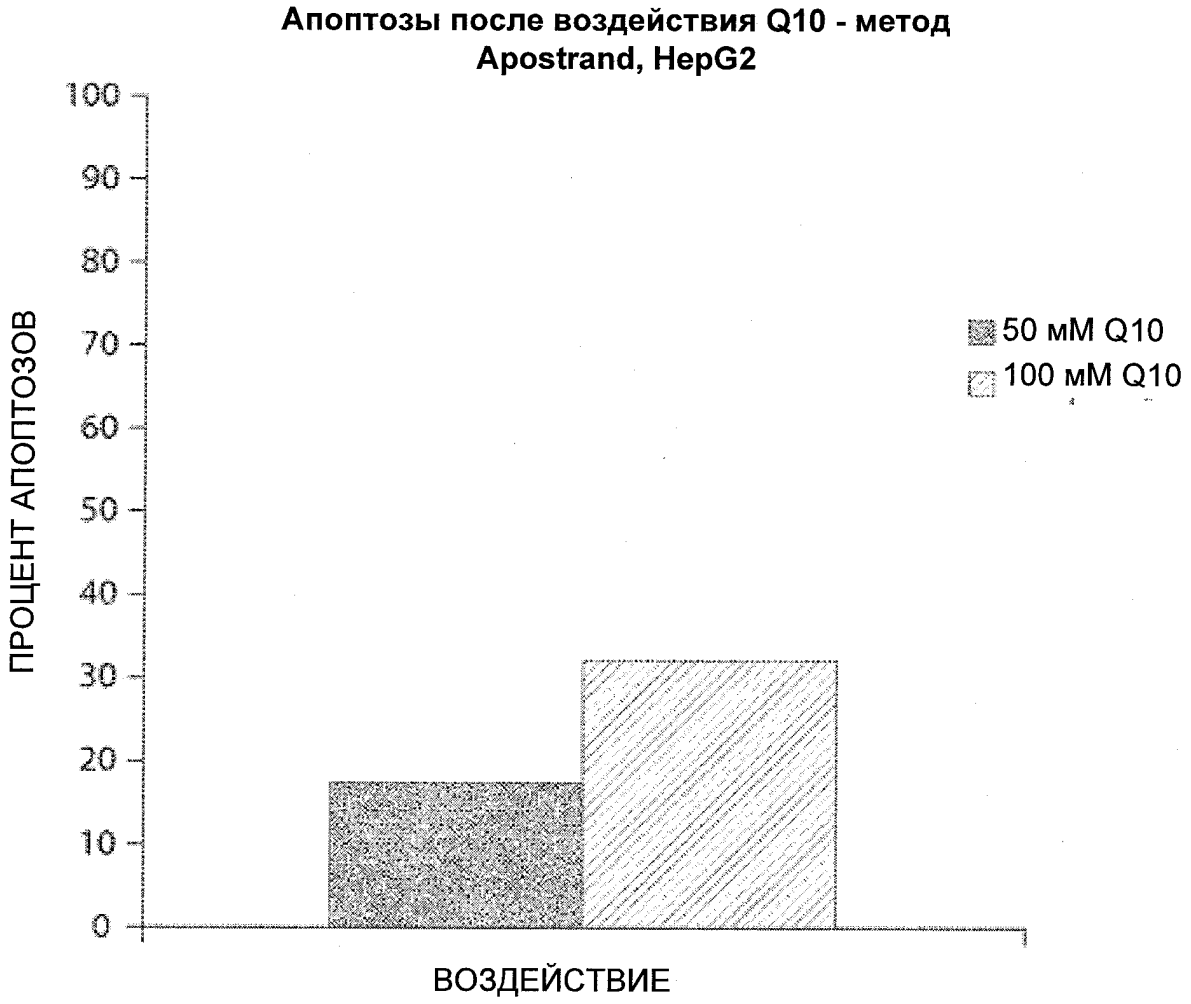
ФИГ. 4


Действие Q10 на HepG2 клетки – анализ Nexin
(7500 клеток)
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
80
70
60
50
40
30
20
10
0
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК

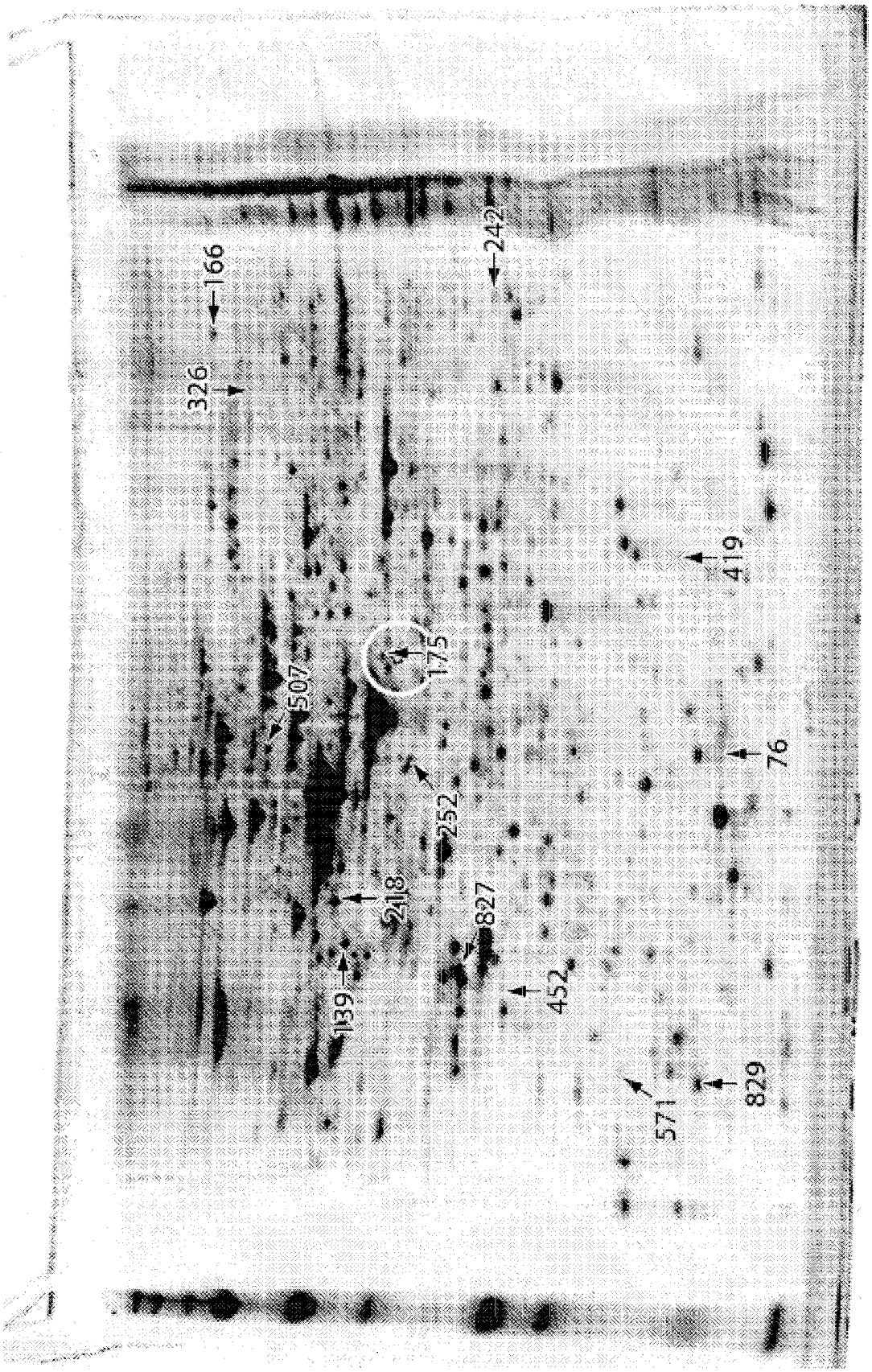
ФИГ. 5


Действие Q10 на MCF-7 клетки – анализ Nexin
(7500 клеток)
ПРОЦЕНТ КЛЕТОК
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
КОНТРОЛЬ
50 мМ Q10
100 мМ Q10
DEBRIS
ЖИВЫЕ КЛЕТКИ
ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ
РАННИЙ АПОПТОЗ
КАТЕГОРИЯ КЛЕТОК

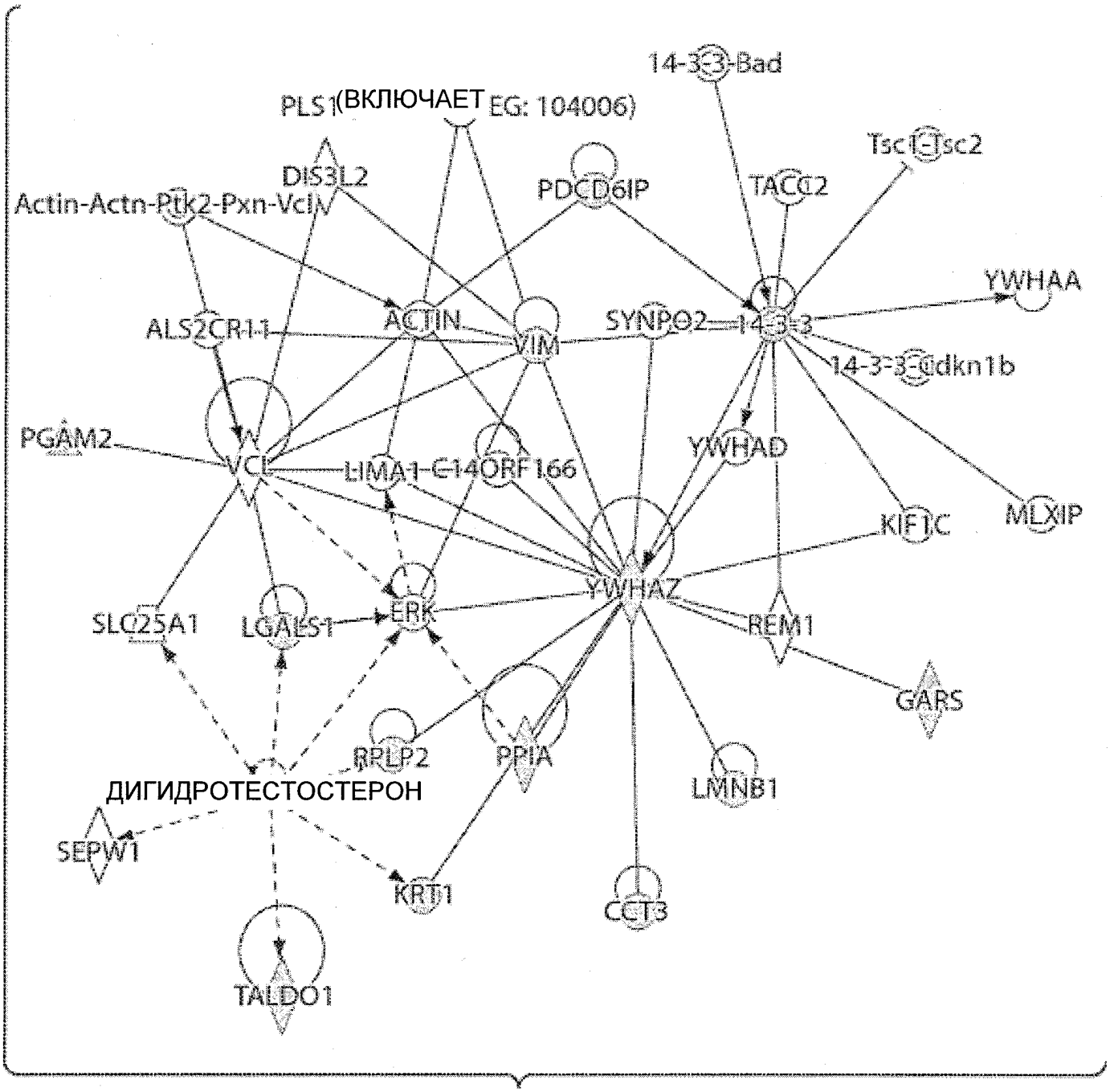
ФИГ. 6


Апоптозы после воздействия Q10 - метод Apostrand, HepG2
ПРОЦЕНТ АПОПТОЗОВ
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50 мМ Q10
100 мМ Q10
ВОЗДЕЙСТВИЕ

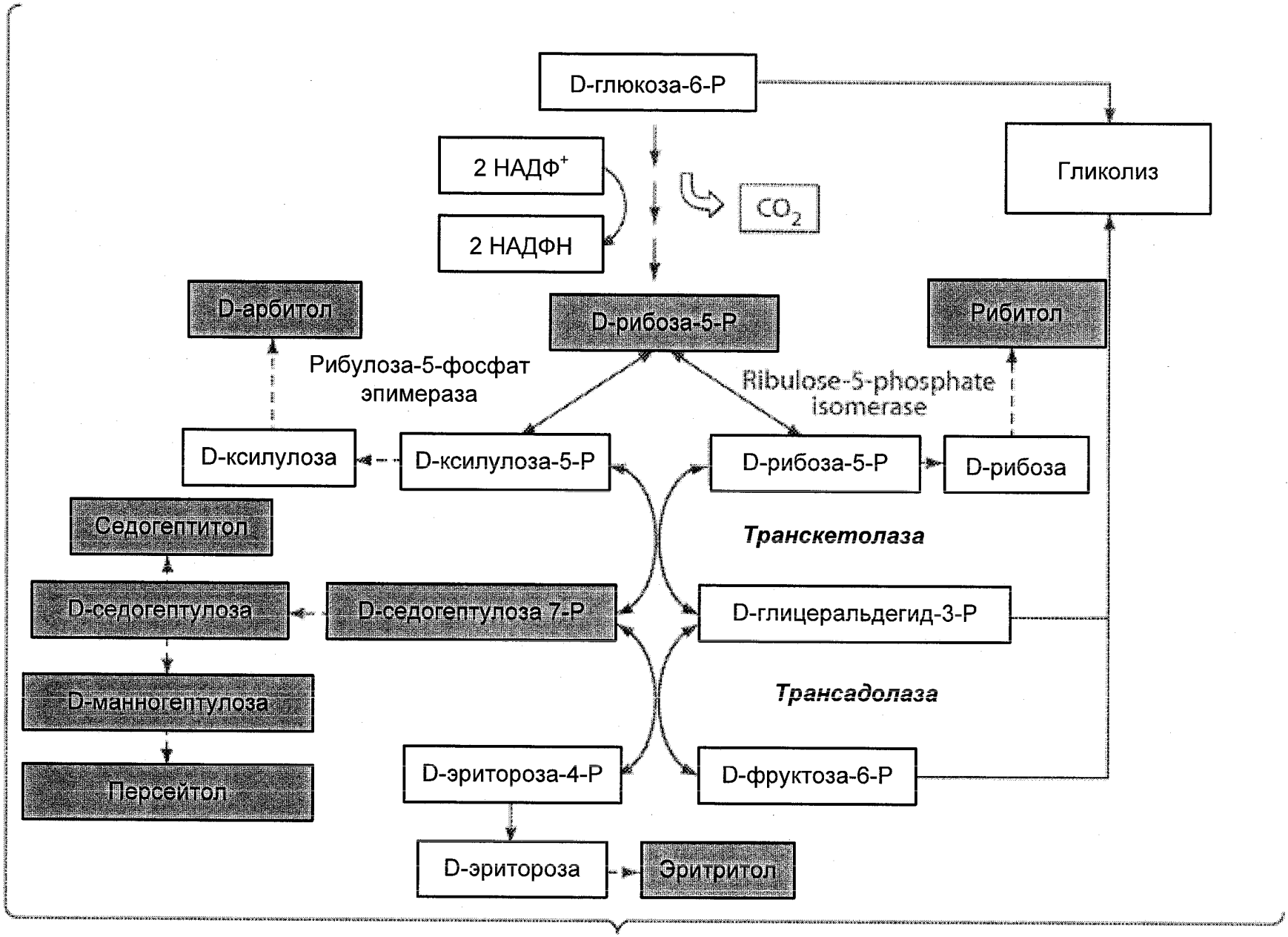
ФИГ. 7



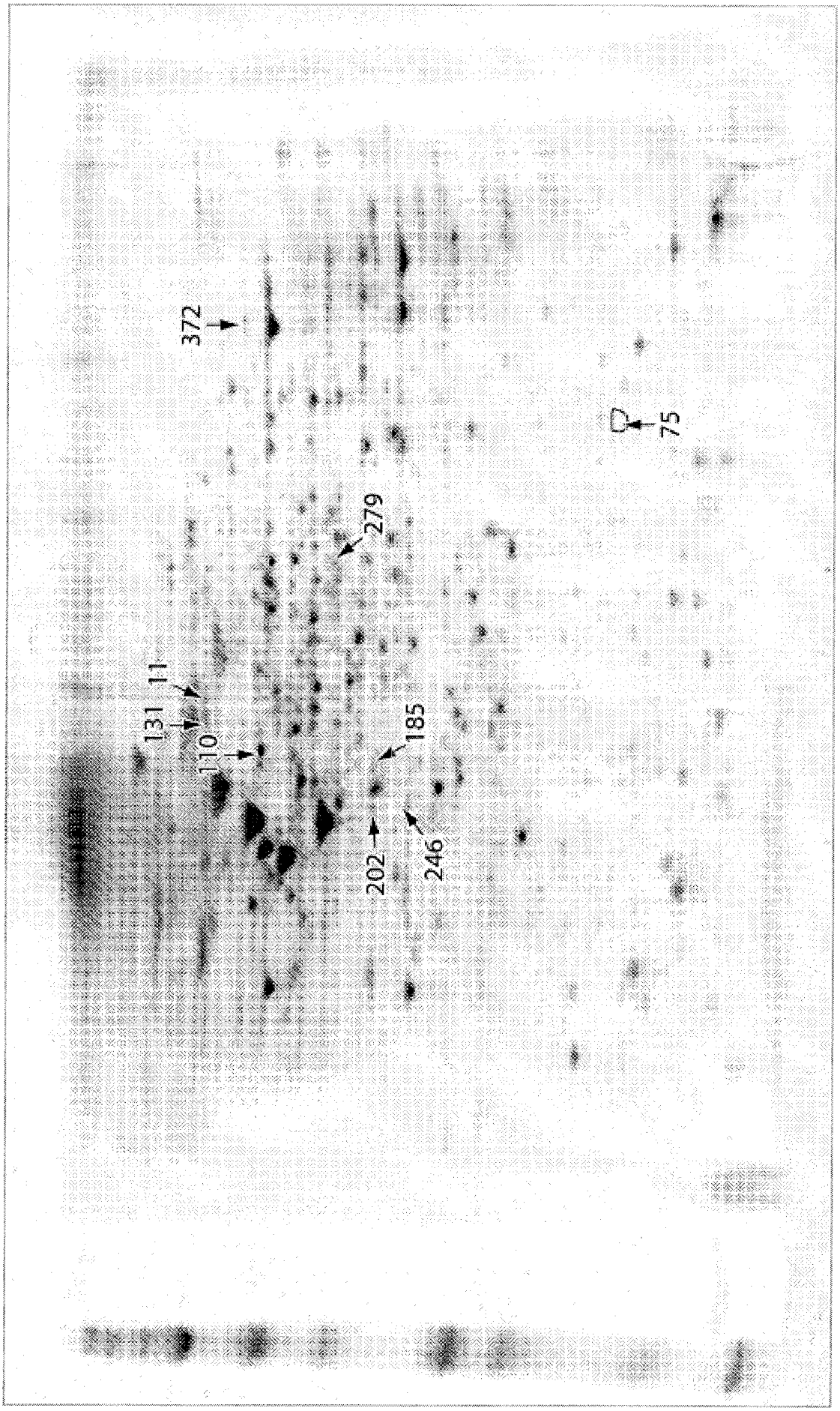
ФИГ. 8


14-3-3-Bad
PLS1(ВКЛЮЧАЕТ EG: 104006)
Tsc1-Tsc2
DIS3L2
PDCD6IP
TACC2
Actin-Actn-Ptk2-Pxn-Vcln
YWHAA
ALS2CR11
ACTIN
VIM
SYNPO2
14-3-3
14-3-3-Cdkn1b
PGAM2
VCL
LIMA1-C14ORF166
YWHAD
KIF1C
MLXIP
YWHAZ
SLC25A1
LGALS1
ERK
REM1
GARS
RPLP2
PPIA
LMNB1
ДИГИДРОТЕСТОСТЕРОН
SEPW1
KRT1
CCT3
TALDO1

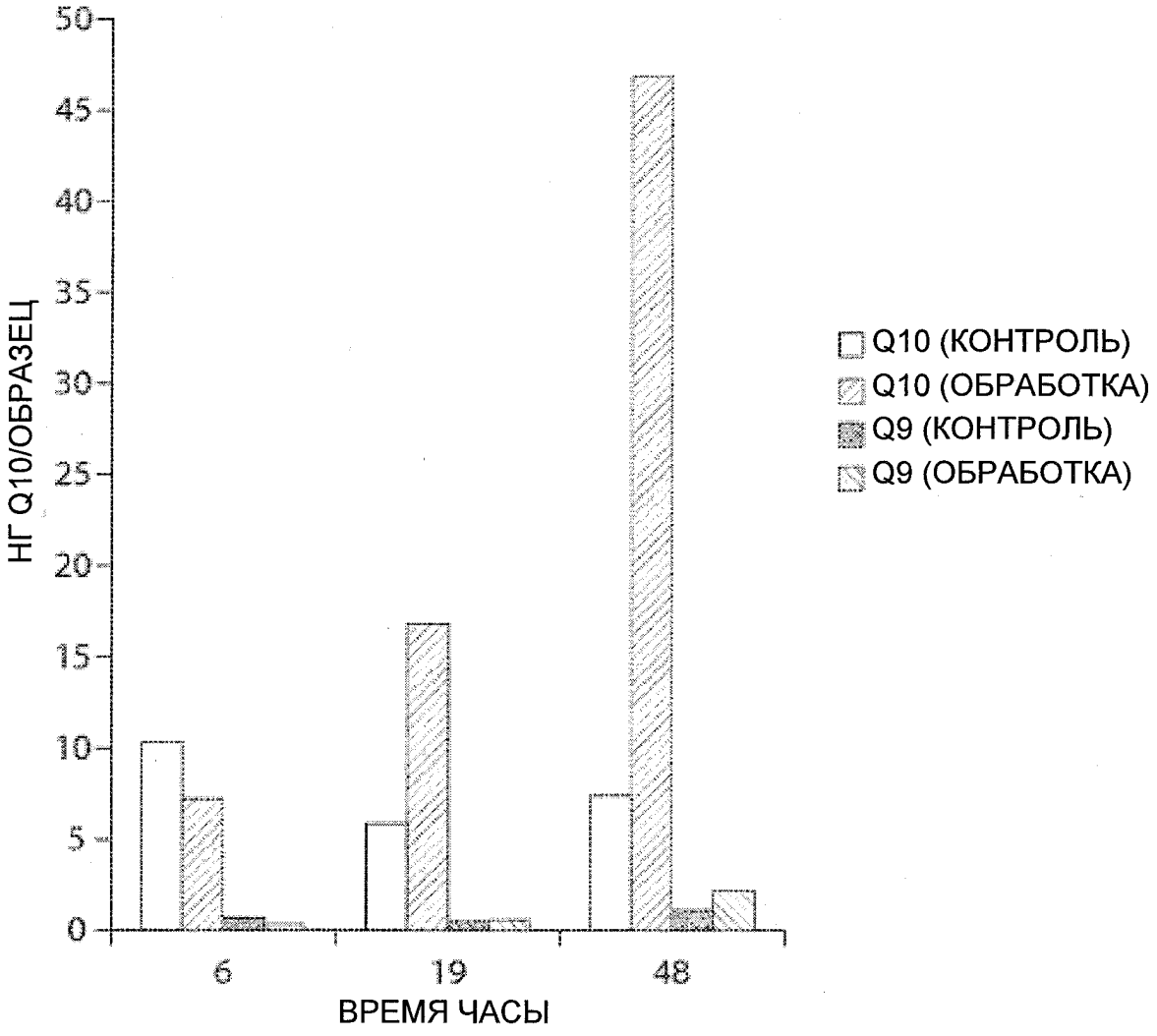
ФИГ. 9


D-глюкоза-6-P
2 НАДФ+
2 НАДФН
CO2
Гликолиз
D-арбитол
D-рибоза-5-P
Рибитол
Рибулоза-5-фосфат эпимераза
Ribulose-5-phosphate isomerase
D-ксилулоза
D-ксилулоза-5-P
D-рибоза-5-P
D-рибоза
Седогептитол
Транскетолаза
D-седогептулоза
D-седогептулоза 7-P
D-глицеральдегид-3-P
D-манногептулоза
Трансадолаза
Персейтол
D-эритроза-4-P
D-фруктоза-6-P
D-эритроза
Эритритол

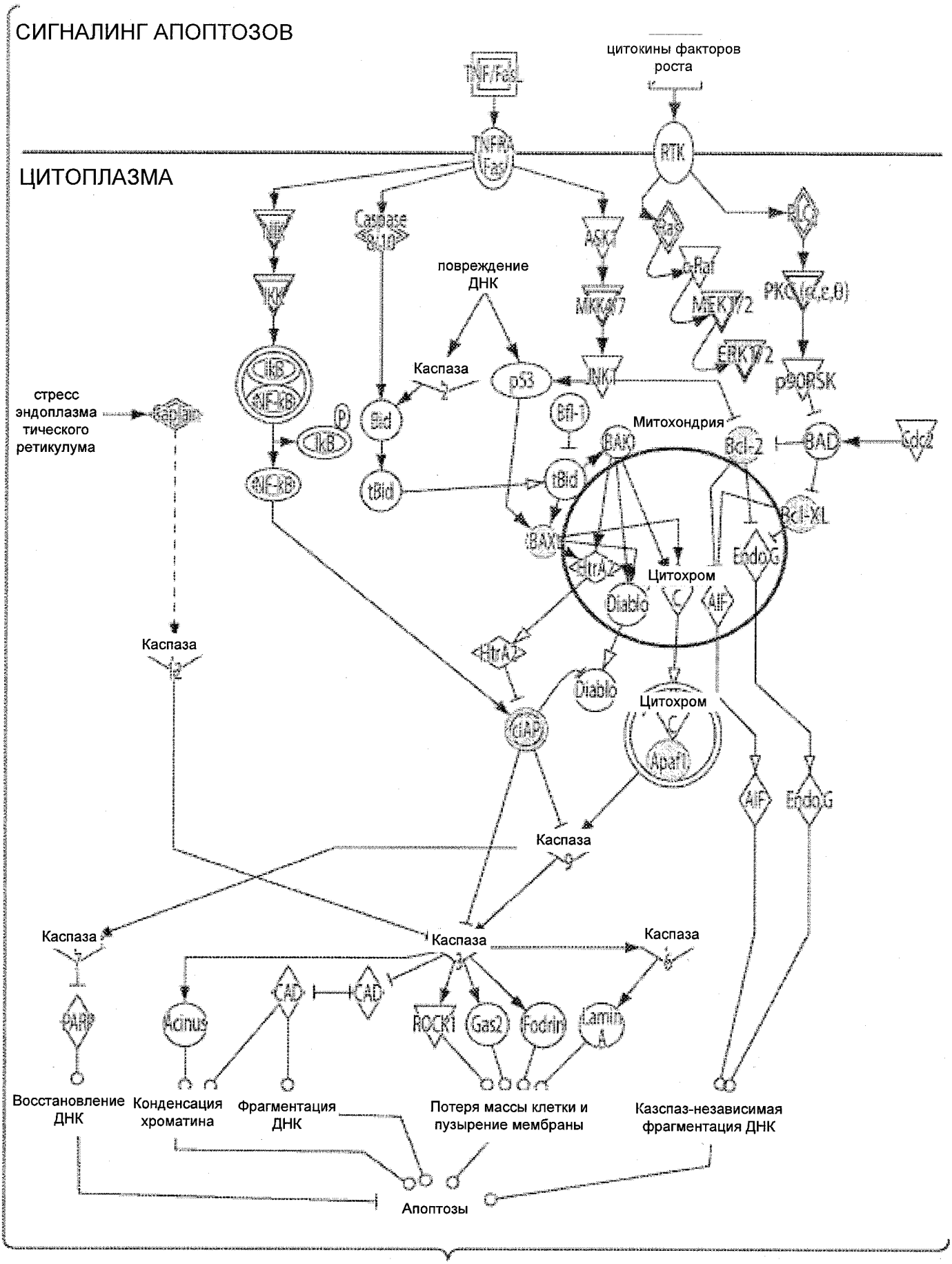
ФИГ. 10



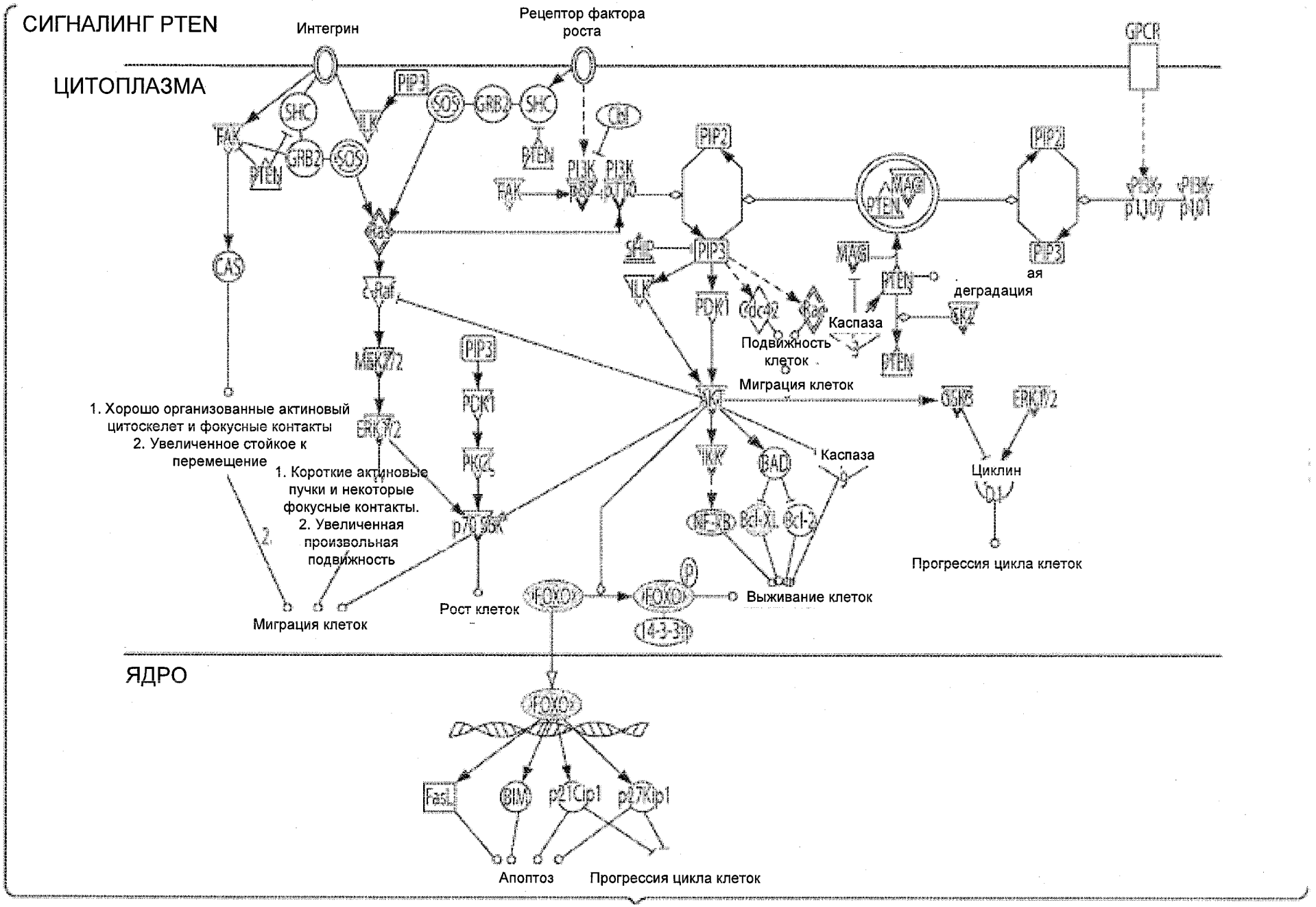
ФИГ. 11


50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
НГ Q10/ОБРАЗЕЦ
6
19
48
ВРЕМЯ ЧАСЫ
Q10 (КОНТРОЛЬ)
Q10 (ОБРАБОТКА)
Q9 (КОНТРОЛЬ)
Q9 (ОБРАБОТКА)

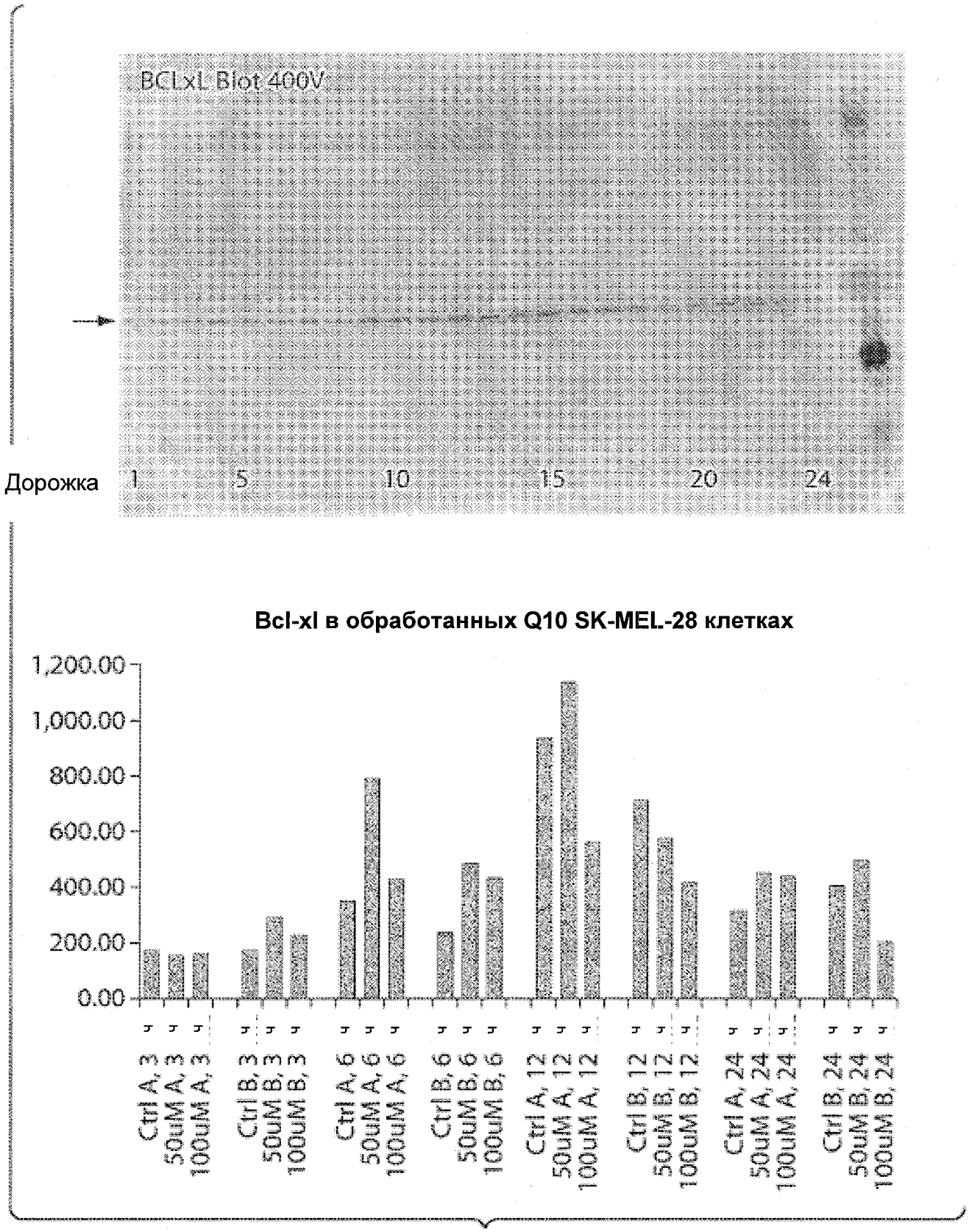
ФИГ. 12


СИГНАЛИНГ АПОПТОЗОВ
цитокины факторов роста
TNF/FasL
TNFRA (Fas)
RTK
ЦИТОПЛАЗМА
повреждение ДНК
Caspase 8,10
ASK1
Ras
cRaf
PKC(α,ε,θ)
MKK4/7
MEK1/2
ERK1/2
p90RSK
Каспаза
p53
JNK1
стресс эндоплазматического ретикулума
Bid
Bfl-1
Митохондрия
BAD
Bcl-2
Cdc2
tBid
BAX
Bcl-XL
Cytochrom C
Diablo
4iF
HtrA2
EndoG
Каспаза 12
Каспаза 9
Каспаза 3
Каспаза 6
Каспаза 7
PARP
Acinus
CAD
ICAD
ROCK1
Gas2
Fodrin
Lamin A
Восстановление ДНК
Конденсация хроматина
Фрагментация ДНК
Потеря массы клетки и пузырение мембраны
Каспаз-независимая фрагментация ДНК
Апоптозы

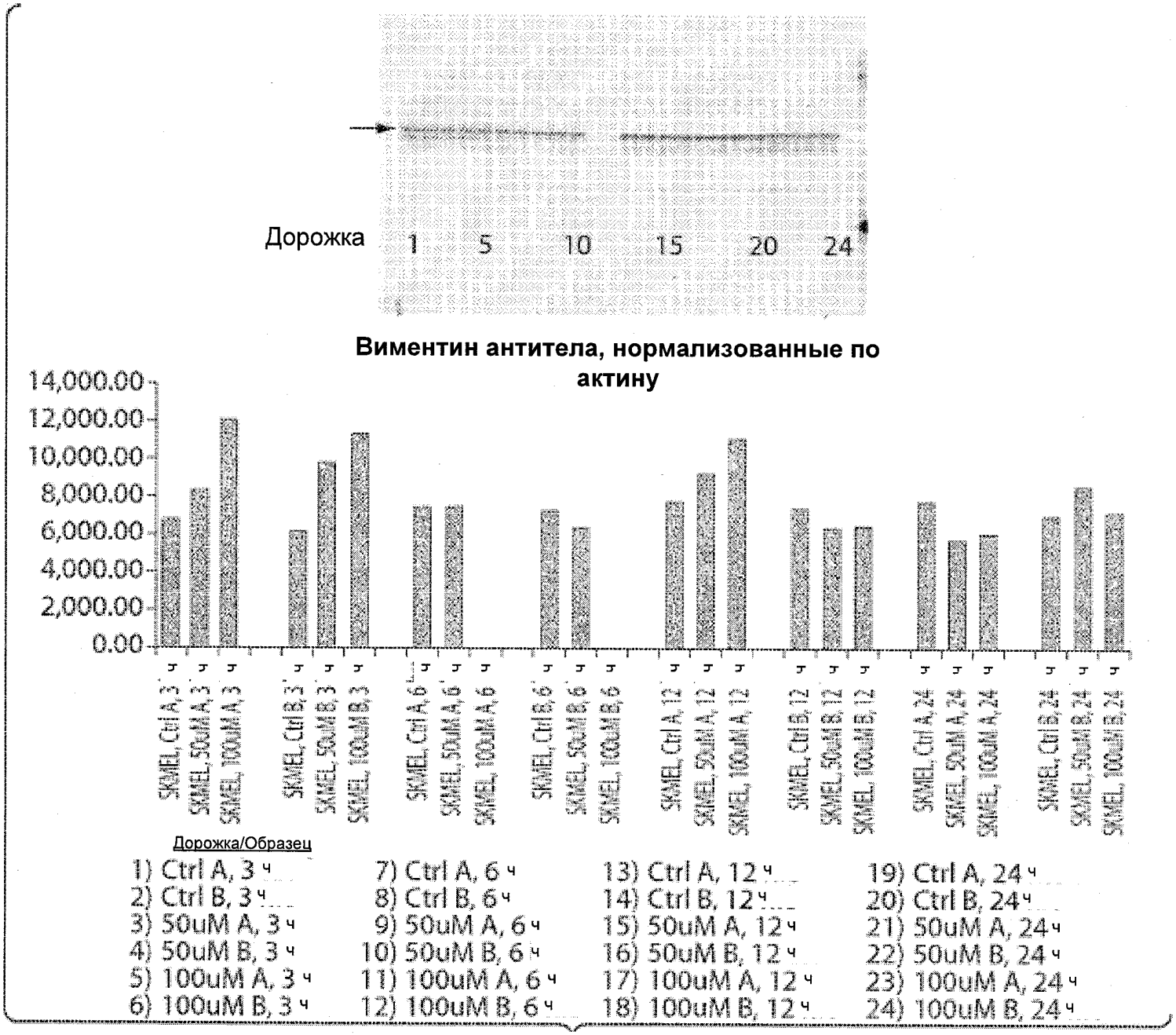
ФИГ. 13А


СИГНАЛИНГ PTEN
Интегрин
Рецептор фактора роста
GPCR
ЦИТОПЛАЗМА
PIP3
SOS
GRB2
SHC
FAK
PTEN
PI3K
PIP2
CAS
c-Raf
MEK1/2
ERK1/2
PDK1
PKCζ
p70 S6K
1. Хорошо организованные актиновый цитоскелет и фокусные контакты
2. Увеличенное стойкое к перемещение
1. Короткие актиновые пучки и некоторые фокусные контакты.
2. Увеличенная произвольная подвижность
Миграция клеток
Рост клеток
Подвижность клеток
Миграция клеток
деградация
Каспаза
Каспаза
Циклин
Прогрессия цикла клеток
Выживание клеток
FOXO3
14-3-3
ЯДРО
FasL
BIM
p21Cip1
p27Kip1
Апоптоз
Прогрессия цикла клеток

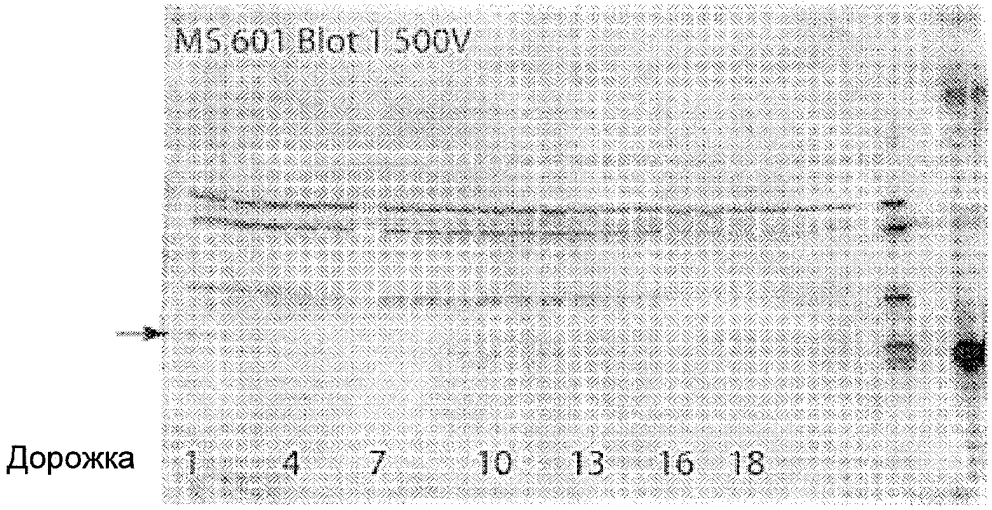
ФИГ. 13B


BCLxL Blot 400V
Дорожка
1
5
10
15
20
24
Bcl-xl в обработанных Q10 SK-MEL-28 клетках
1,200.00
1,000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
Ctrl A, 3
50uM A, 3
100uM A, 3
Ctrl B, 3
50uM B, 3
100uM B, 3
Ctrl A, 6
50uM A, 6
100uM A, 6
Ctrl B, 6
50uM B, 6
100uM B, 6
Ctrl A, 12
50uM A, 12
100uM A, 12
Ctrl B, 12
50uM B, 12
100uM B, 12
Ctrl A, 24
50uM A, 24
100uM A, 24
Ctrl B, 24
50uM B, 24
100uM B, 24

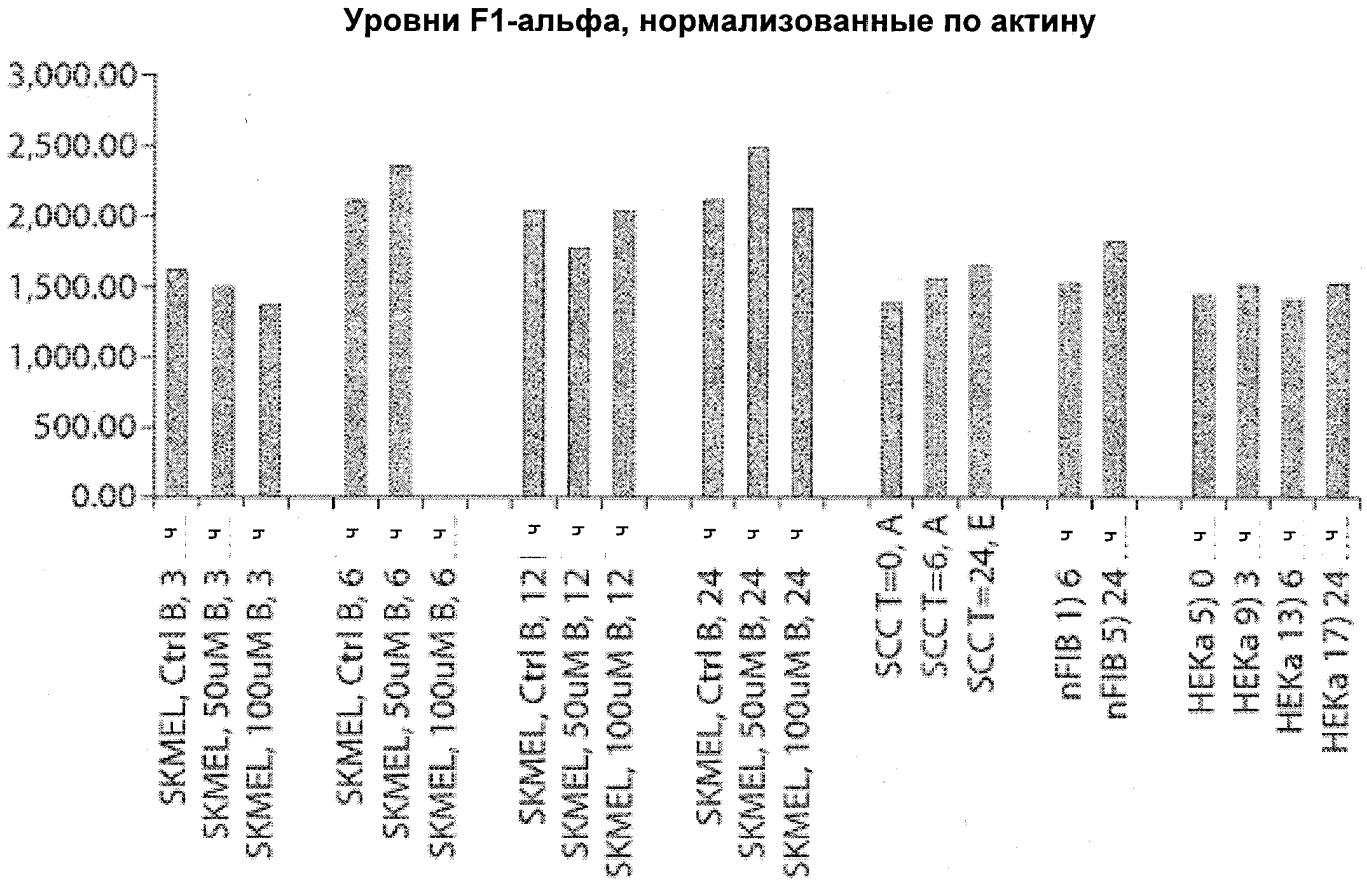
ФИГ. 14


Дорожка
1
5
10
15
20
24
Виментин антитела, нормализованные по актину
14,000.00
12,000.00
10,000.00
8,000.00
6,000.00
4,000.00
2,000.00
0.00
SKMEL, Ctrl A, 3 ч
SKMEL, 50uM A, 3 ч
SKMEL, 100uM A, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl A, 6 ч
SKMEL, 50uM A, 6 ч
SKMEL, 100uM A, 6
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6
SKMEL, Ctrl A, 12 ч
SKMEL, 50uM A, 12 ч
SKMEL, 100uM A, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl A, 24 ч
SKMEL, 50uM A, 24 ч
SKMEL, 100uM A, 24 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
Дорожка/Образец
1) Ctrl A, 3 ч
2) Ctrl B, 3 ч
3) 50uM A, 3 ч
4) 50uM B, 3 ч
5) 100uM A, 3 ч
6) 100uM B, 3 ч
7) Ctrl A, 6 ч
8) Ctrl B, 6 ч
9) 50uM A, 6 ч
10) 50uM B, 6 ч
11) 100uM A, 6 ч
12) 100uM B, 6 ч
13) Ctrl A, 12 ч
14) Ctrl B, 12 ч
15) 50uM A, 12 ч
16) 50uM B, 12 ч
17) 100uM A, 12 ч
18) 100uM B, 12 ч
19) Ctrl A, 24 ч
20) Ctrl B, 24 ч
21) 50uM A, 24 ч
22) 50uM B, 24 ч
23) 100uM A, 24 ч
24) 100uM B, 24 ч

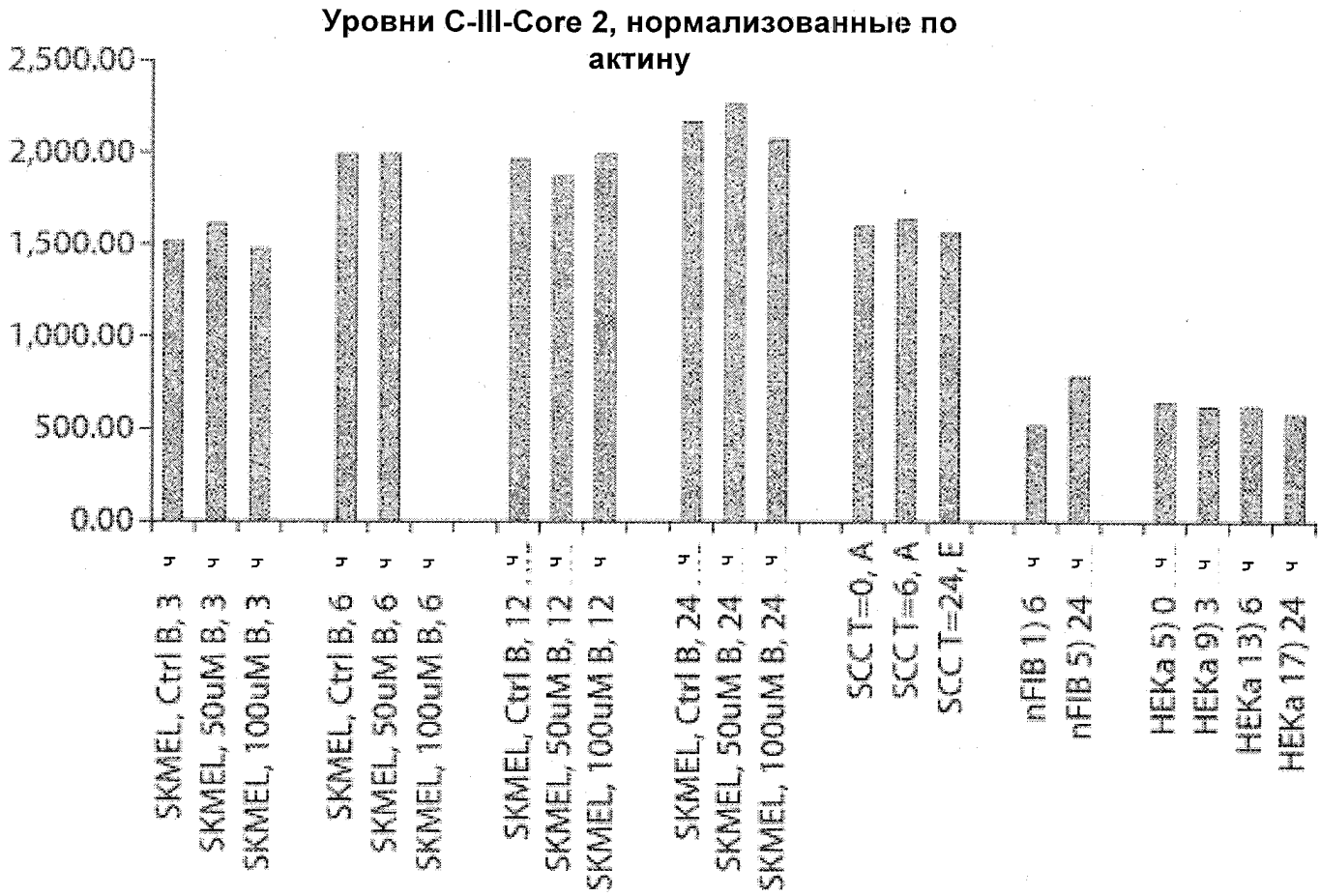
ФИГ. 15


MS 601 Blot 1 500V
Дорожка
1
4
7
10
13
16
18

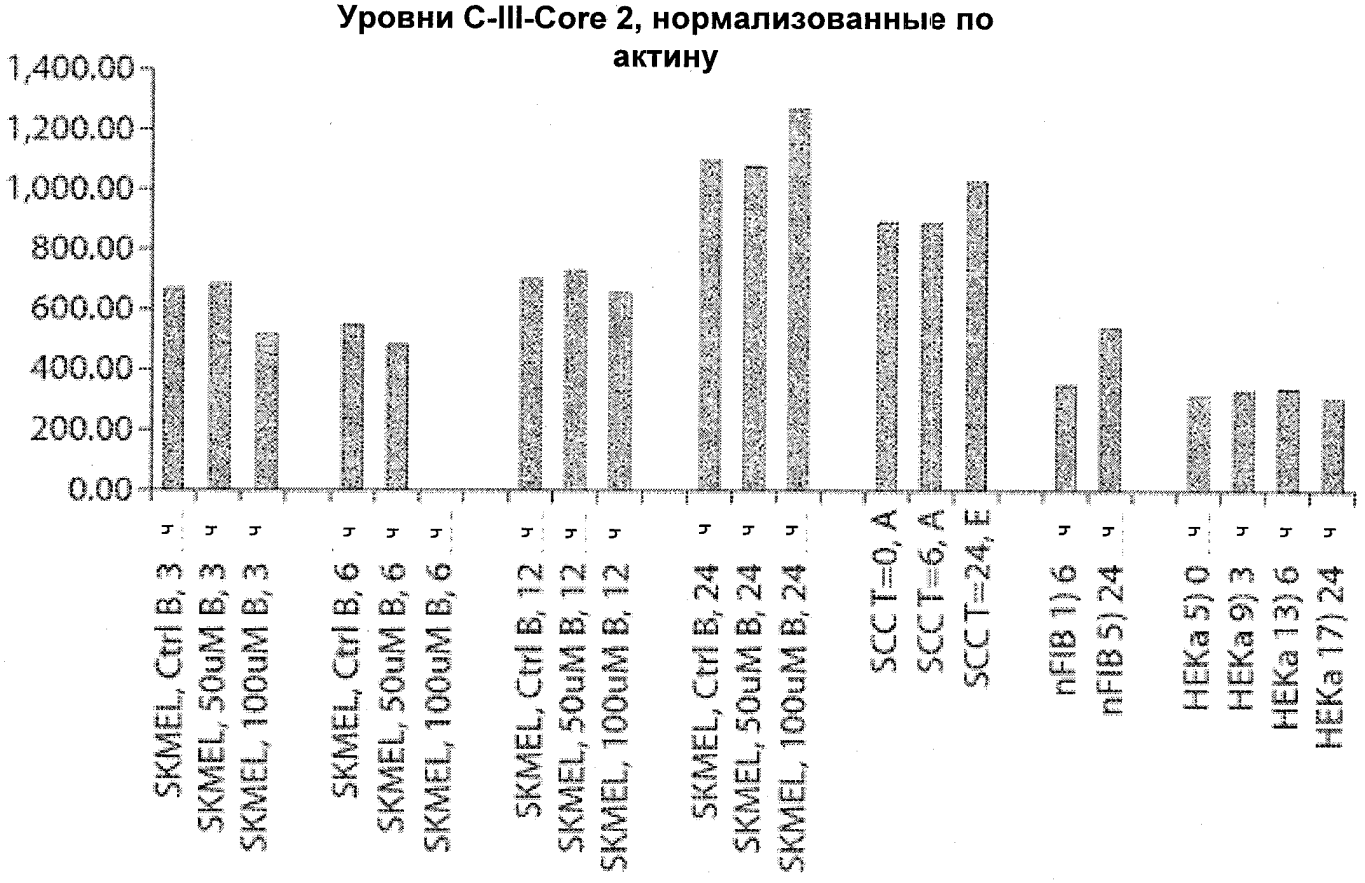
ФИГ. 16


Уровни F1-альфа, нормализованные по актину
3,000.00
2,500.00
2,000.00
1,500.00
1,000.00
500.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

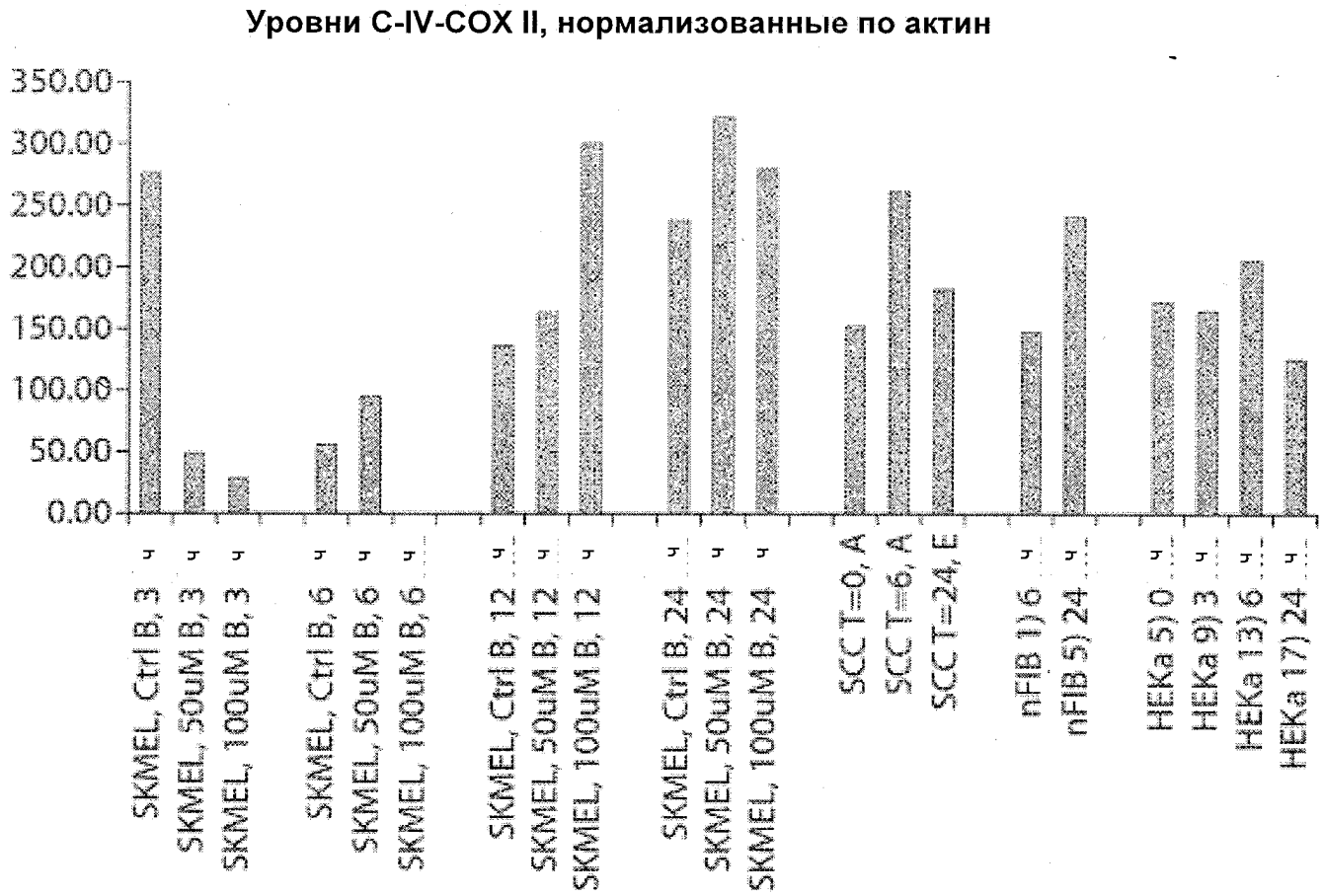
ФИГ. 17


Уровни C-III-Core 2, нормализованные по актину
2,500.00
2,000.00
1,500.00
1,000.00
500.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

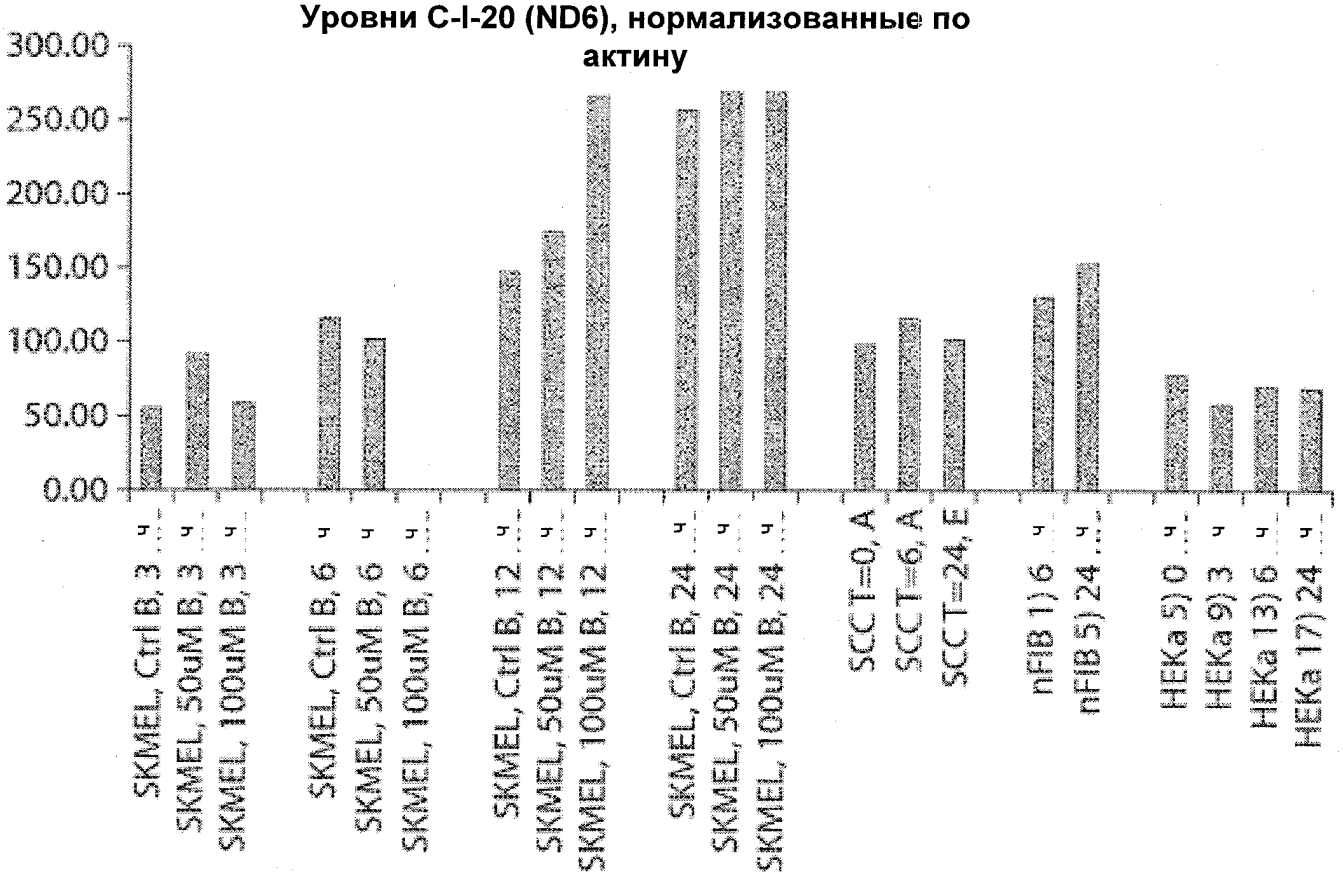
ФИГ. 18


Уровни C-III-Core 2, нормализованные по актину
1,400.00
1,200.00
1,000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

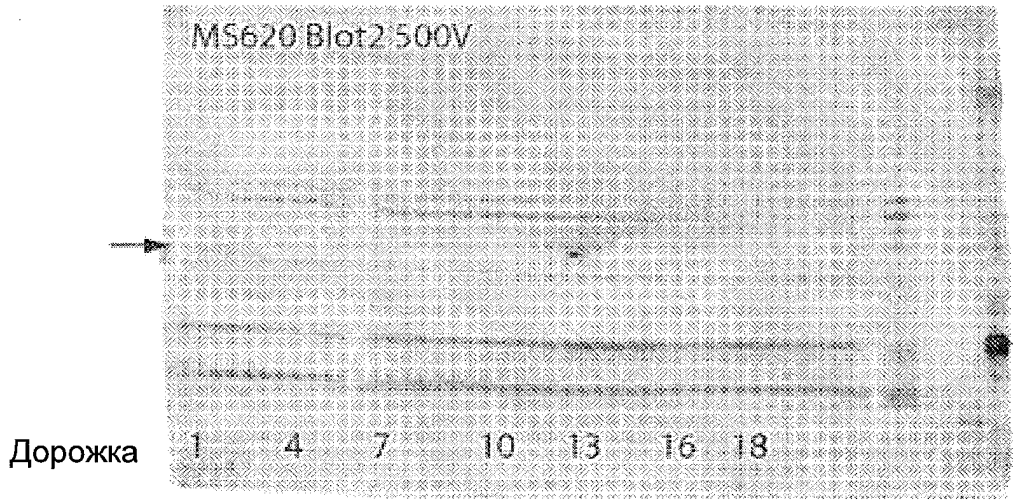
ФИГ. 19


Уровни C-IV-COX II, нормализованные по актин
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

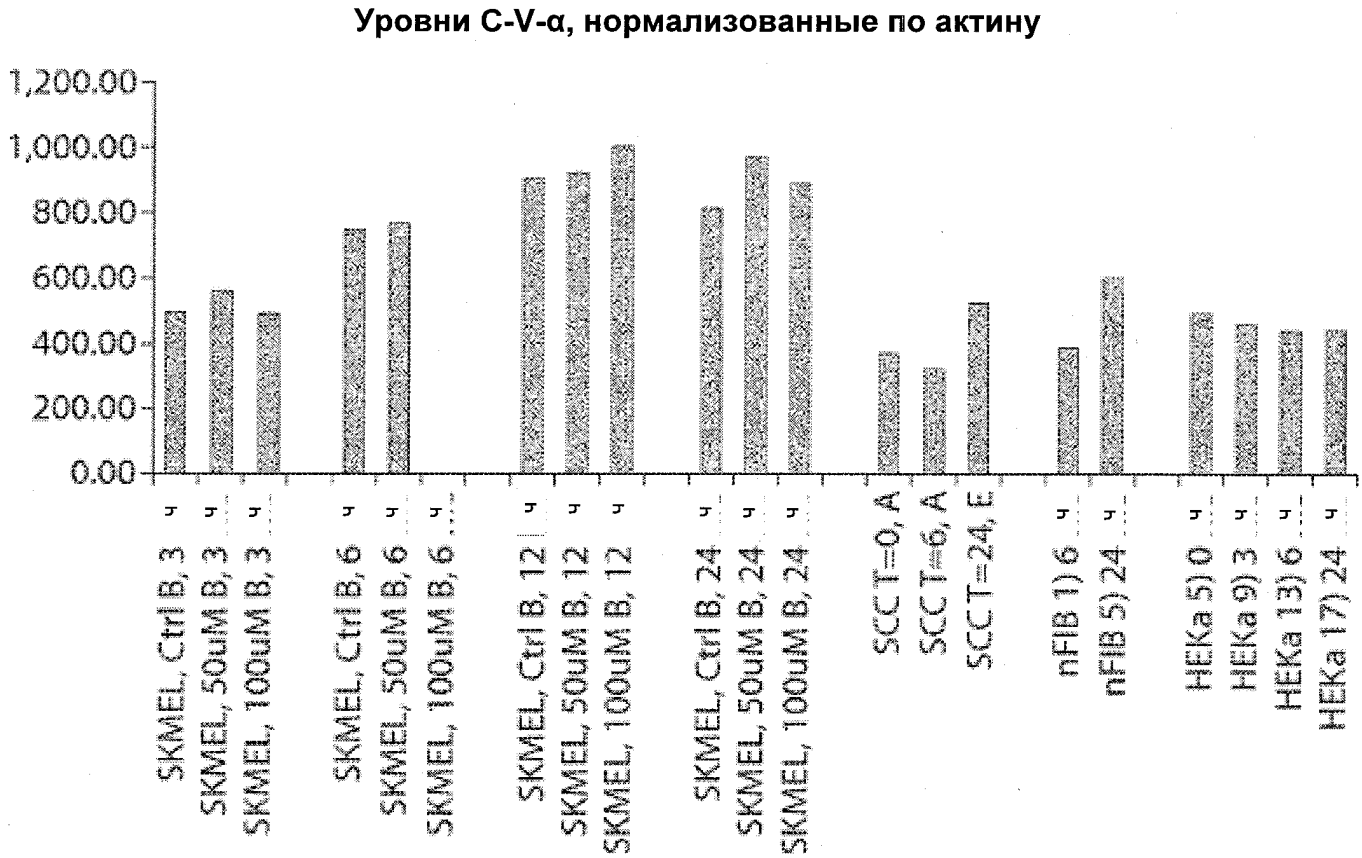
ФИГ. 20


Уровни C-I-20 (ND6), нормализованные по актину
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

ФИГ. 21

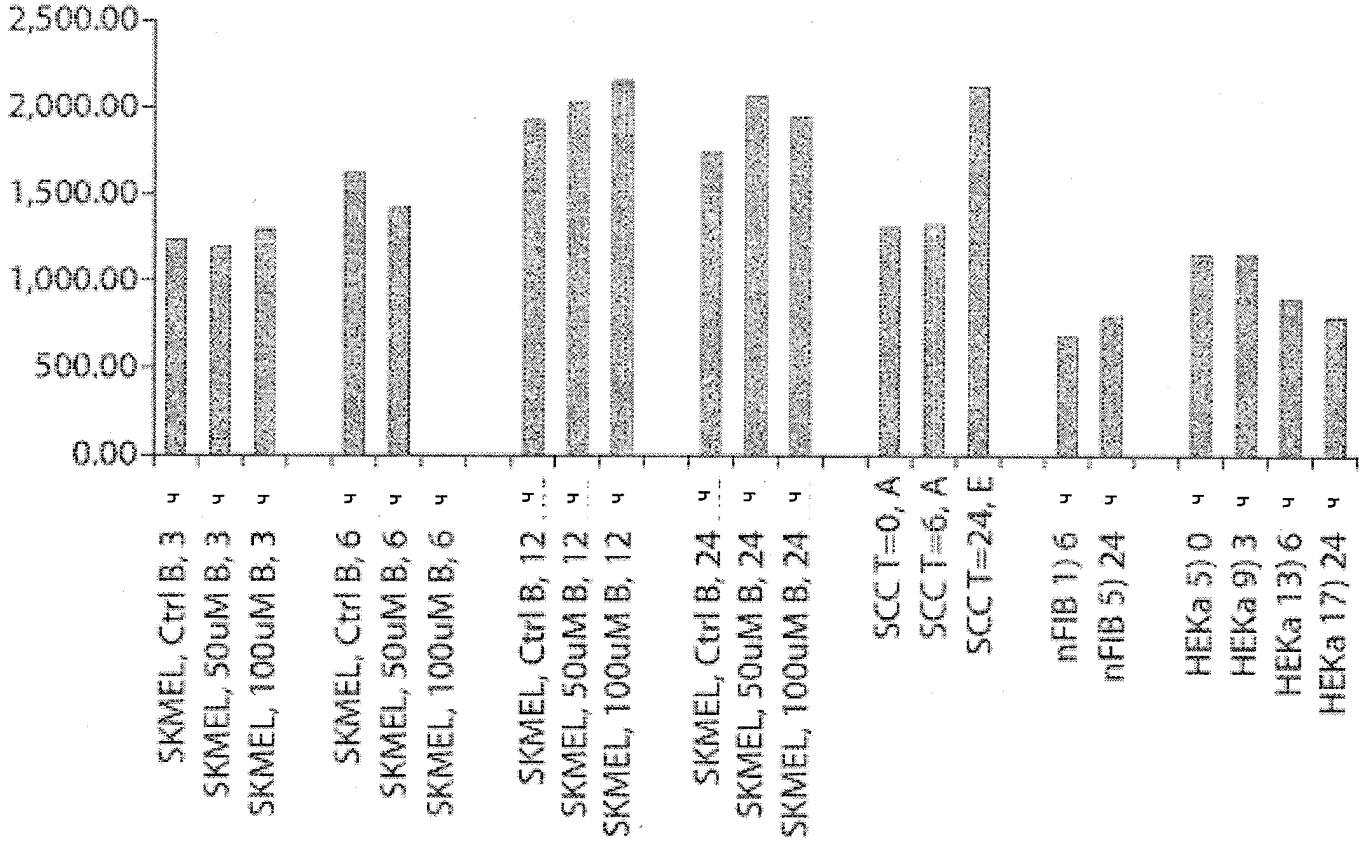

MS620 Blot2 500V
Дорожка
1
4
7
10
13
16
18

ФИГ. 22


Уровни C-V-α, нормализованные по актину
1,200.00
1,000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
SKMEL, Ctrl B, 3 ч
SKMEL, 50uM B, 3 ч
SKMEL, 100uM B, 3 ч
SKMEL, Ctrl B, 6 ч
SKMEL, 50uM B, 6 ч
SKMEL, 100uM B, 6 ч
SKMEL, Ctrl B, 12 ч
SKMEL, 50uM B, 12 ч
SKMEL, 100uM B, 12 ч
SKMEL, Ctrl B, 24 ч
SKMEL, 50uM B, 24 ч
SKMEL, 100uM B, 24 ч
SCC T=0, A
SCC T=6, A
SCC T=24, E
nFIB 1) 6 ч
nFIB 5) 24 ч
HEKa 5) 0 ч
HEKa 9) 3 ч
HEKa 13) 6 ч
HEKa 17) 24 ч

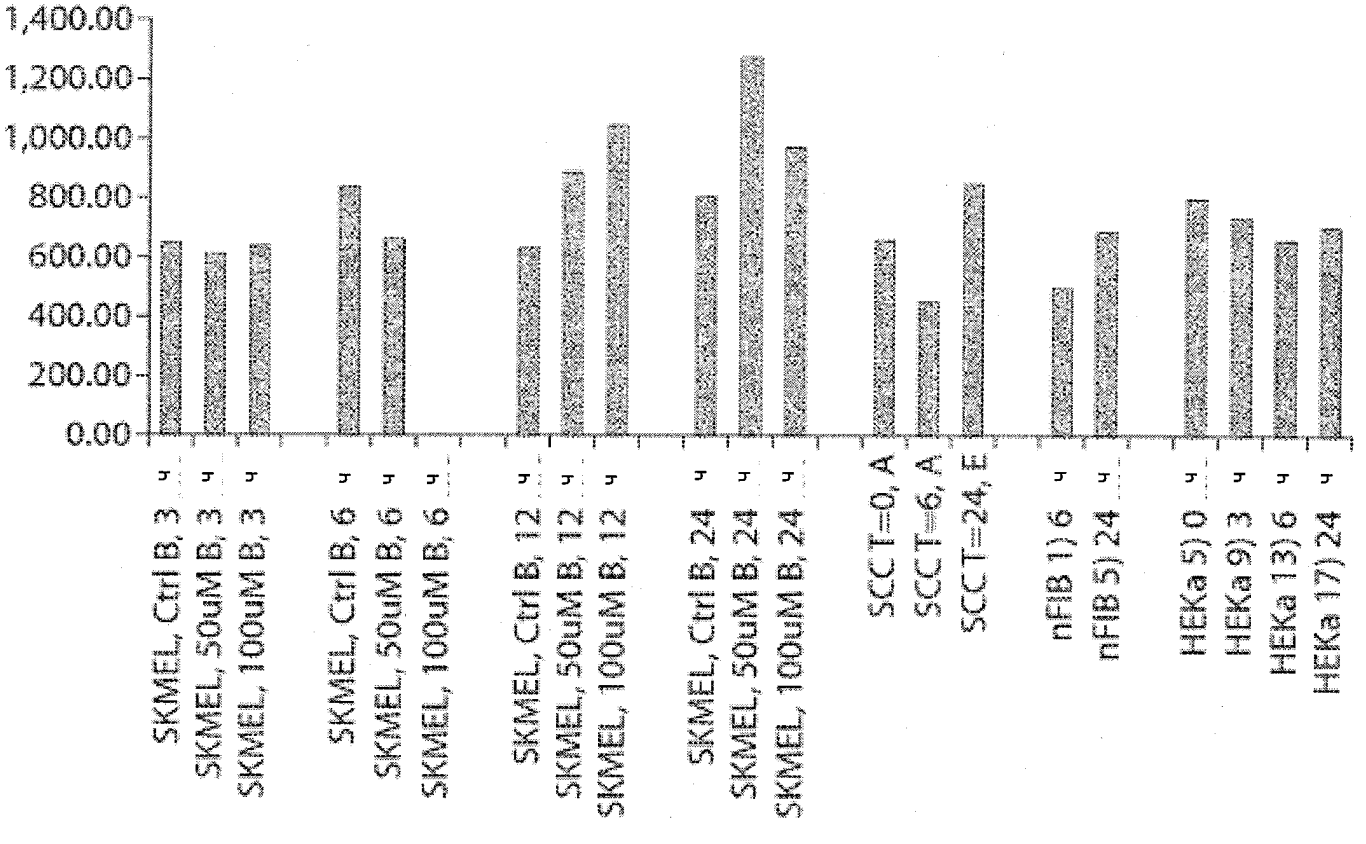
ФИГ. 23

Уровни C-III-Core 1, нормализованные по актину



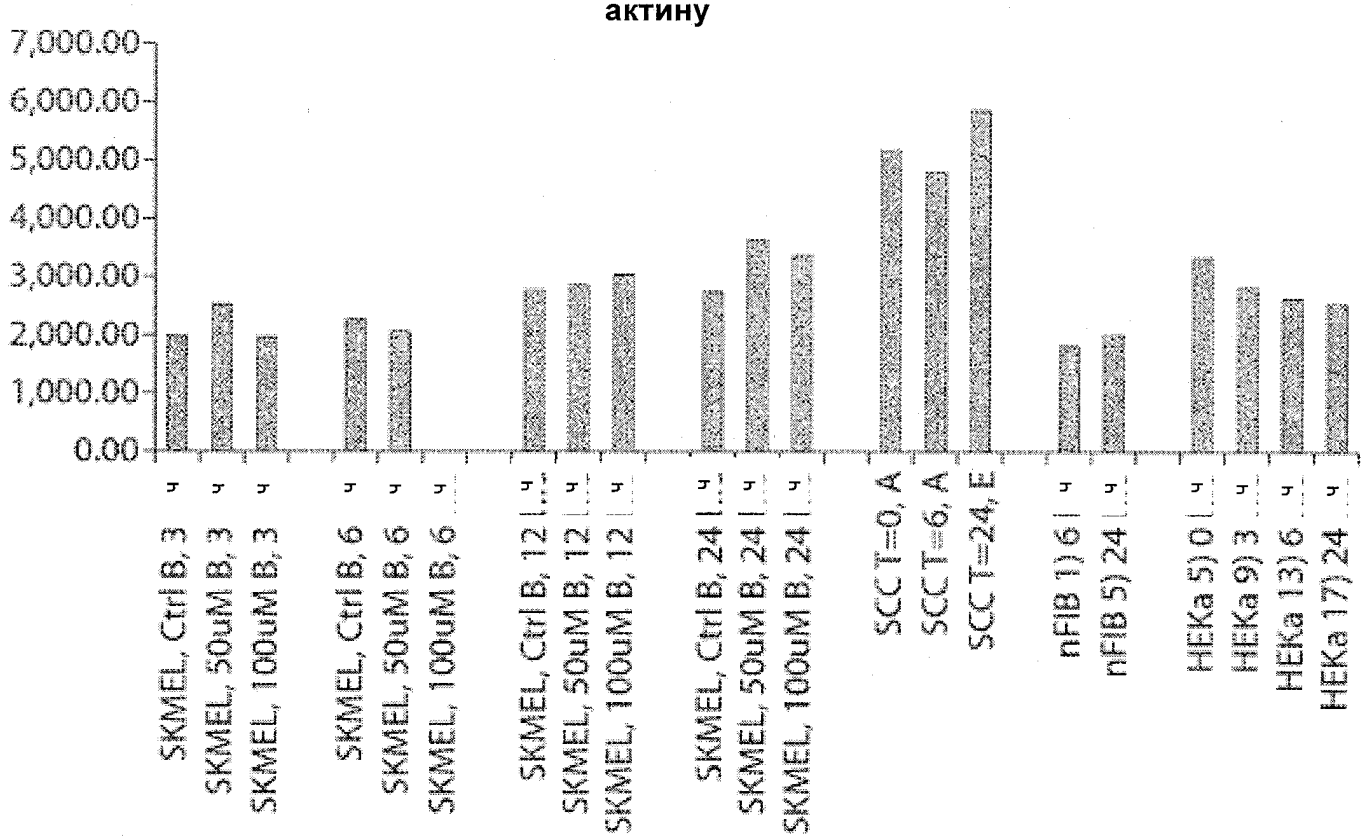
ФИГ. 24

Уровни C-III-Core 2, нормализованные по актину



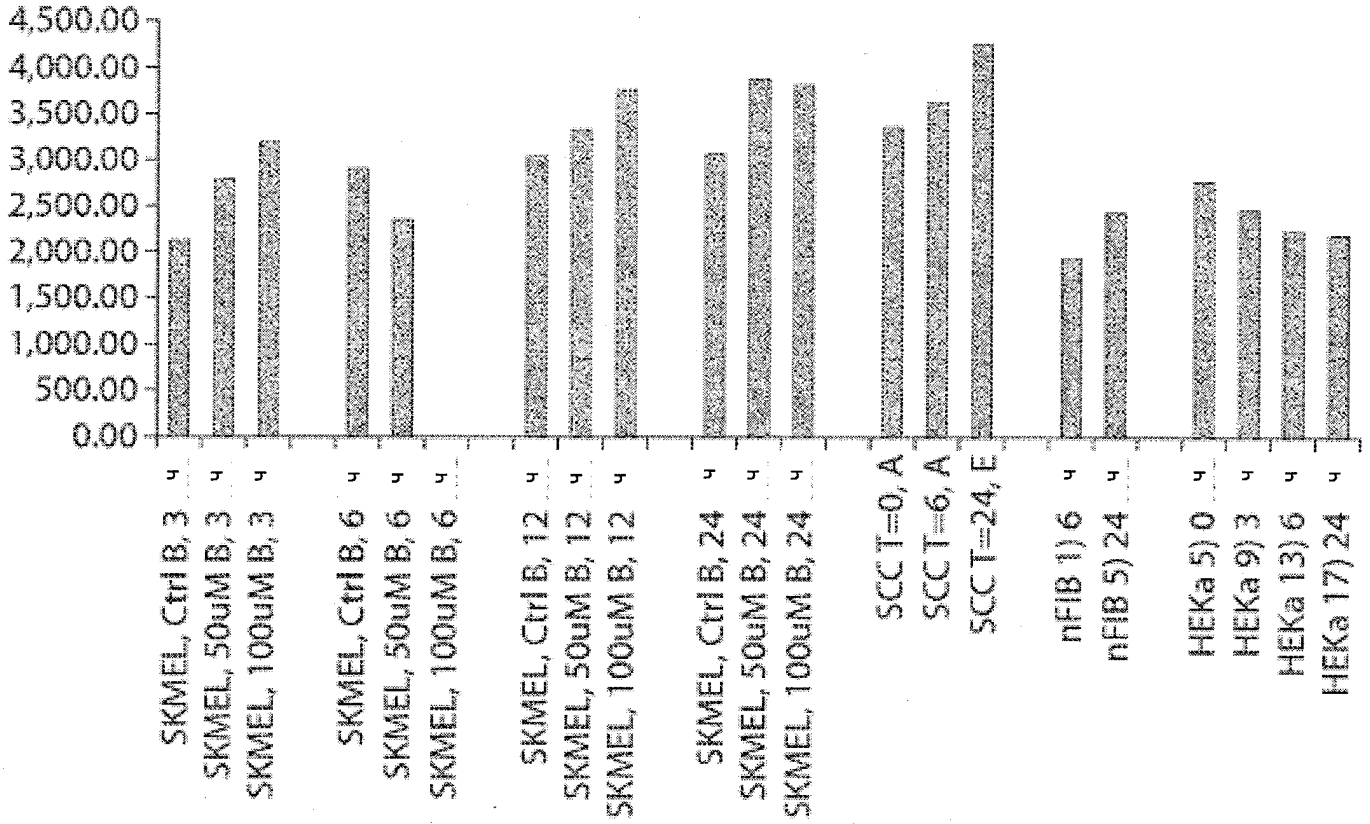
ФИГ. 25

Уровни Циклофилина D, нормализованные по актину

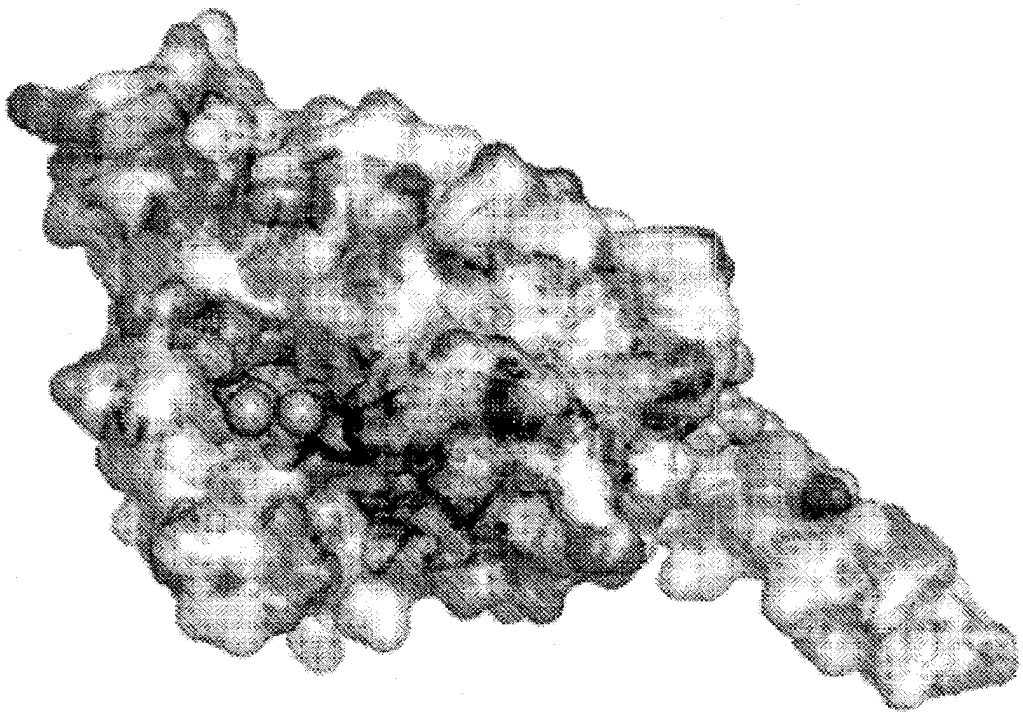


ФИГ. 26

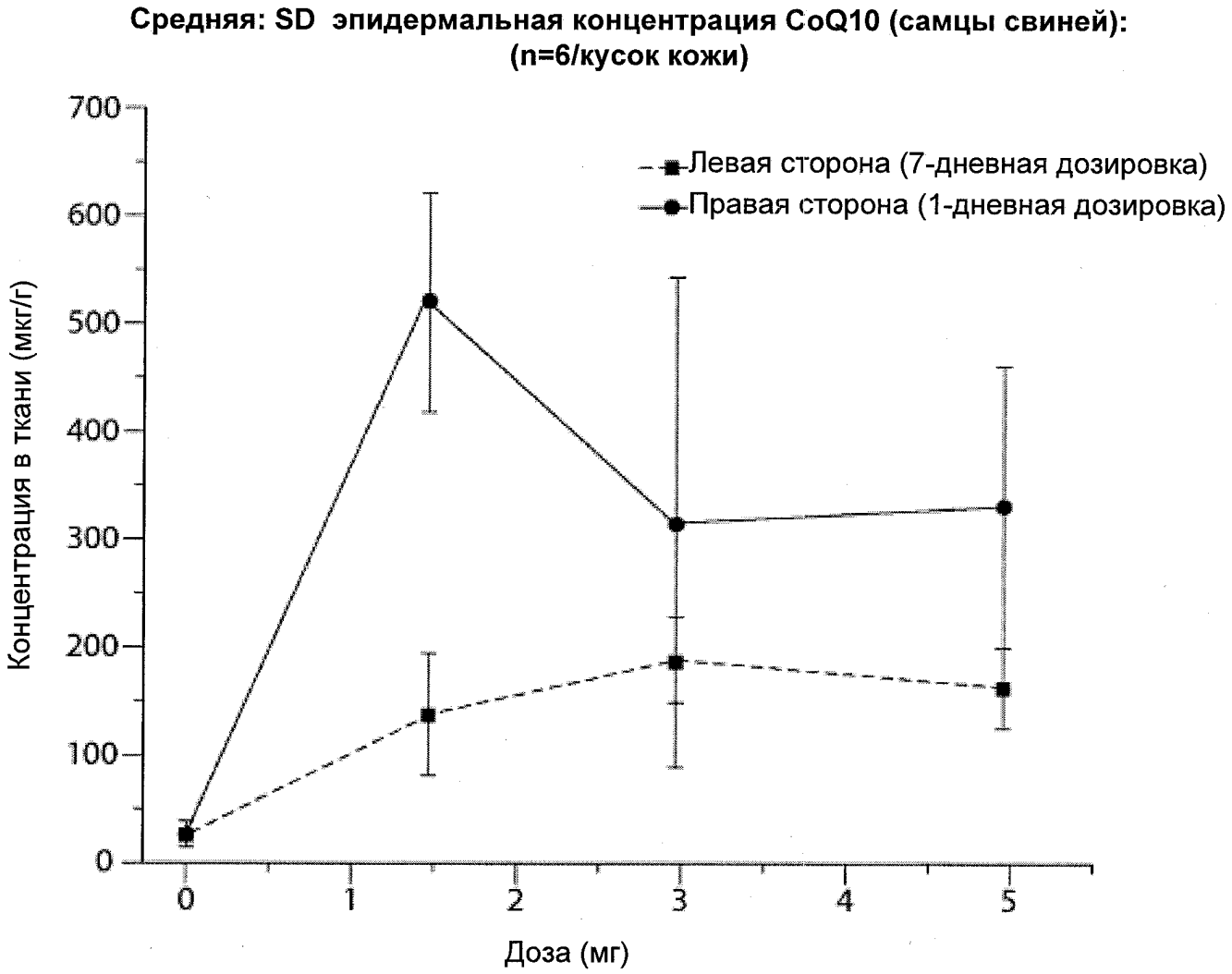
Уровни Цитохрома С, нормализованные по актину



ФИГ. 27

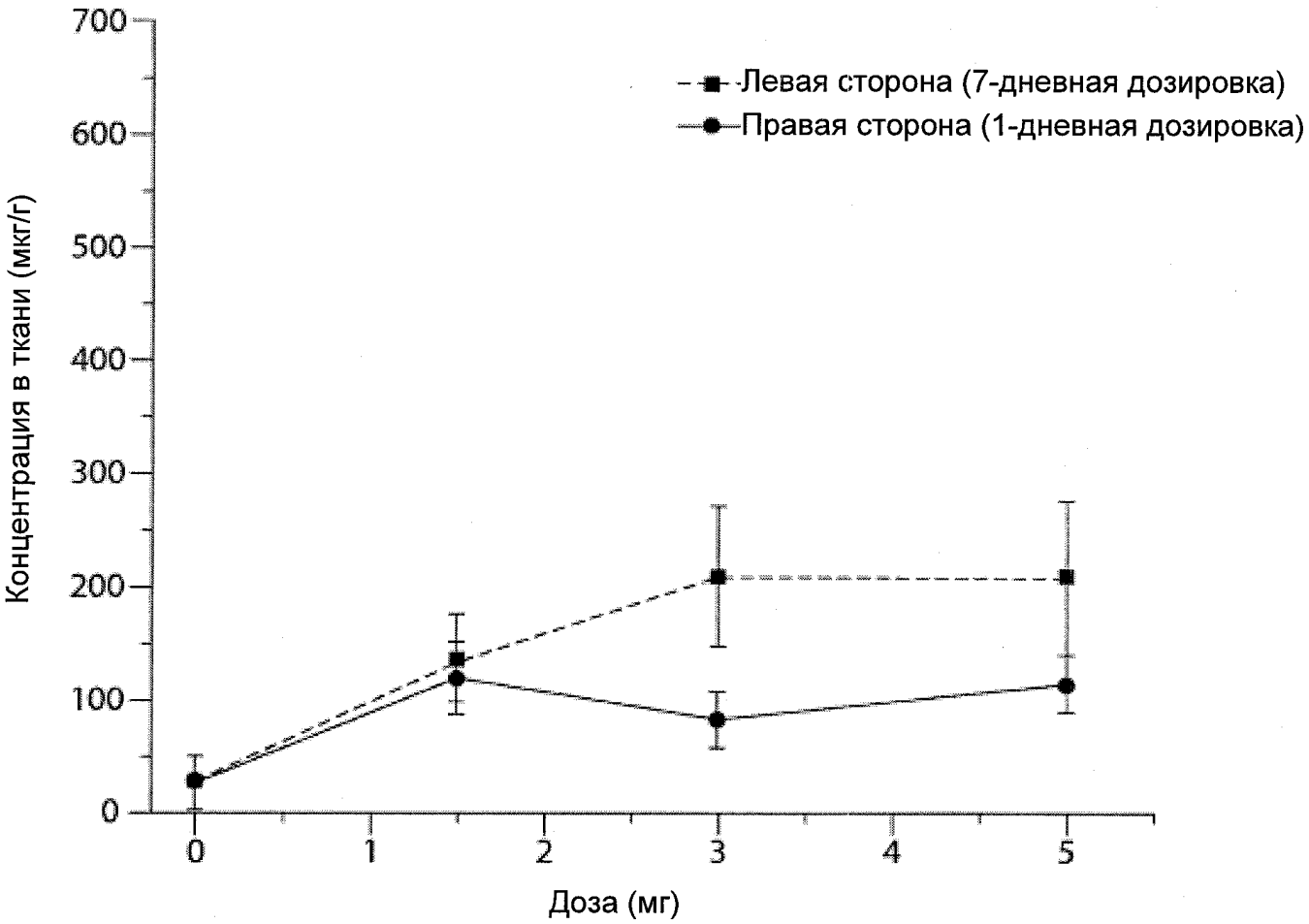


ФИГ. 28

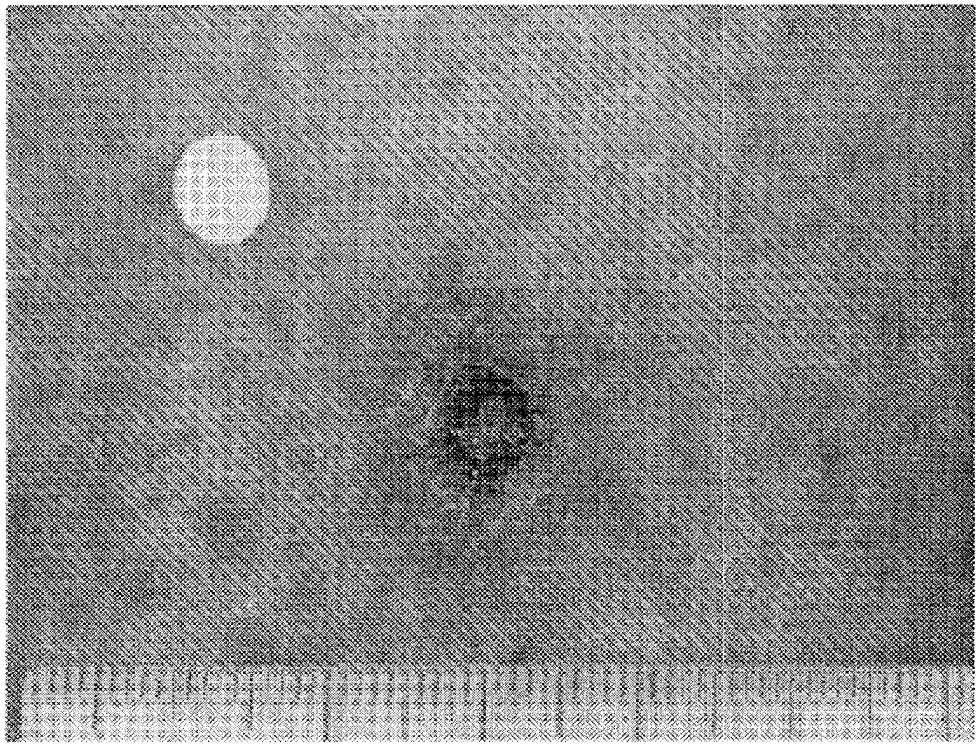

Средняя: SD эпидермальная концентрация CoQ10 (самцы свиней):
(n=6/кусок кожи)
Левая сторона (7-дневная дозировка)
Правая сторона (1-дневная дозировка)
Концентрация в ткани (мкг/г)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
Доза (мг)

ФИГ. 29

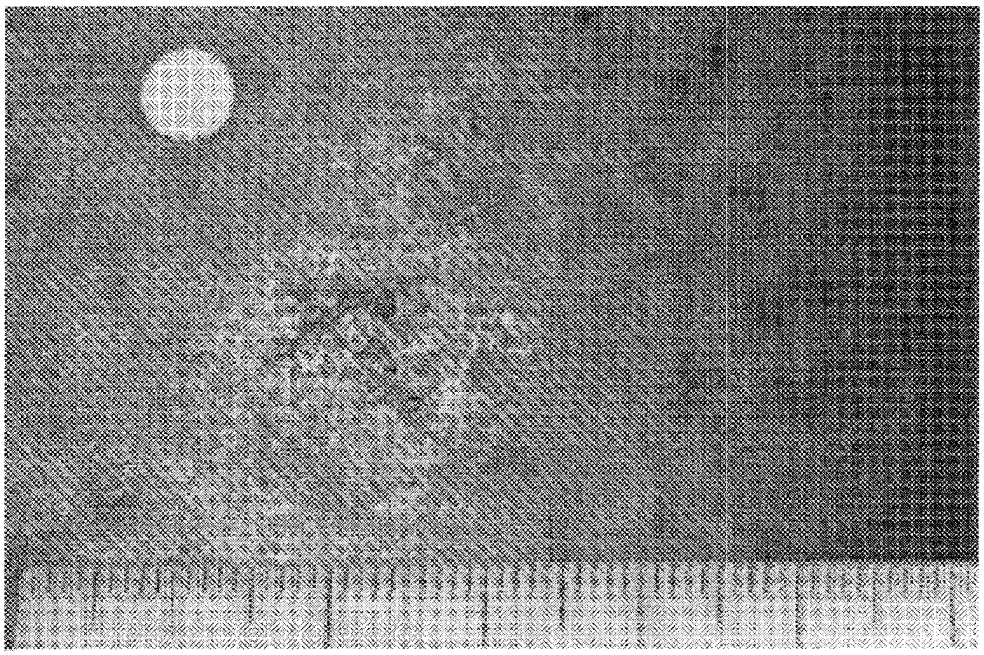
Средняя: SD эпидермальная концентрация CoQ10 (самки свиней): (n=6/кусок кожи)



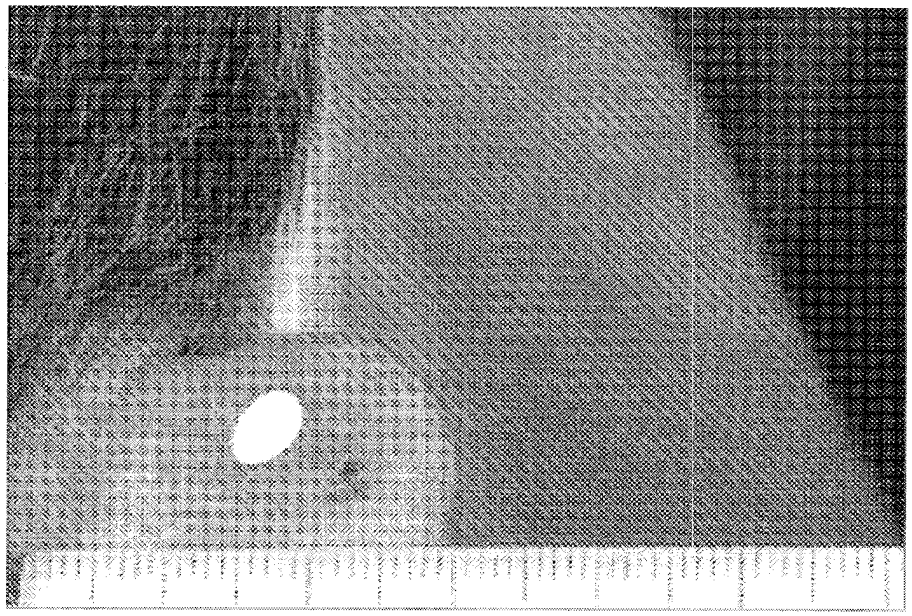
ФИГ. 30



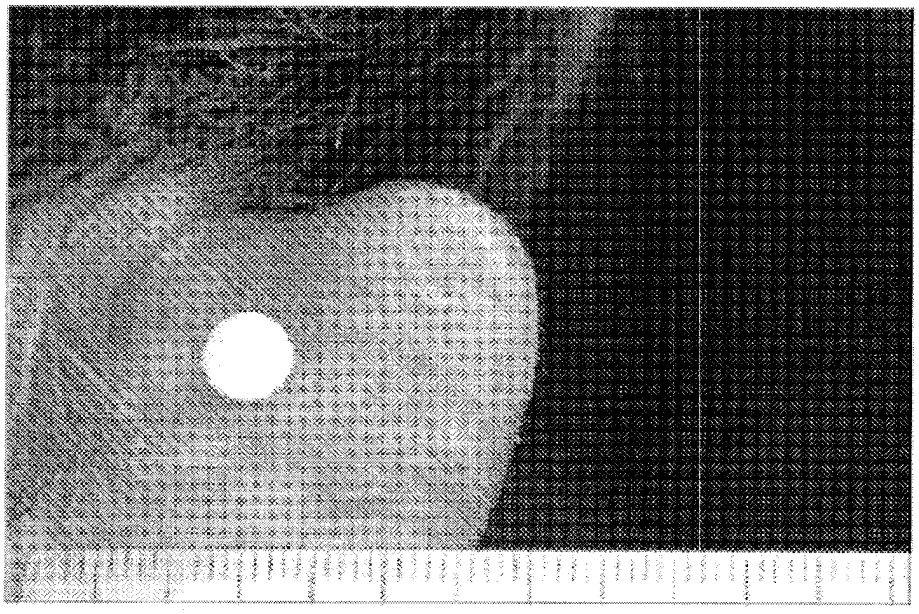
ФИГ. 31



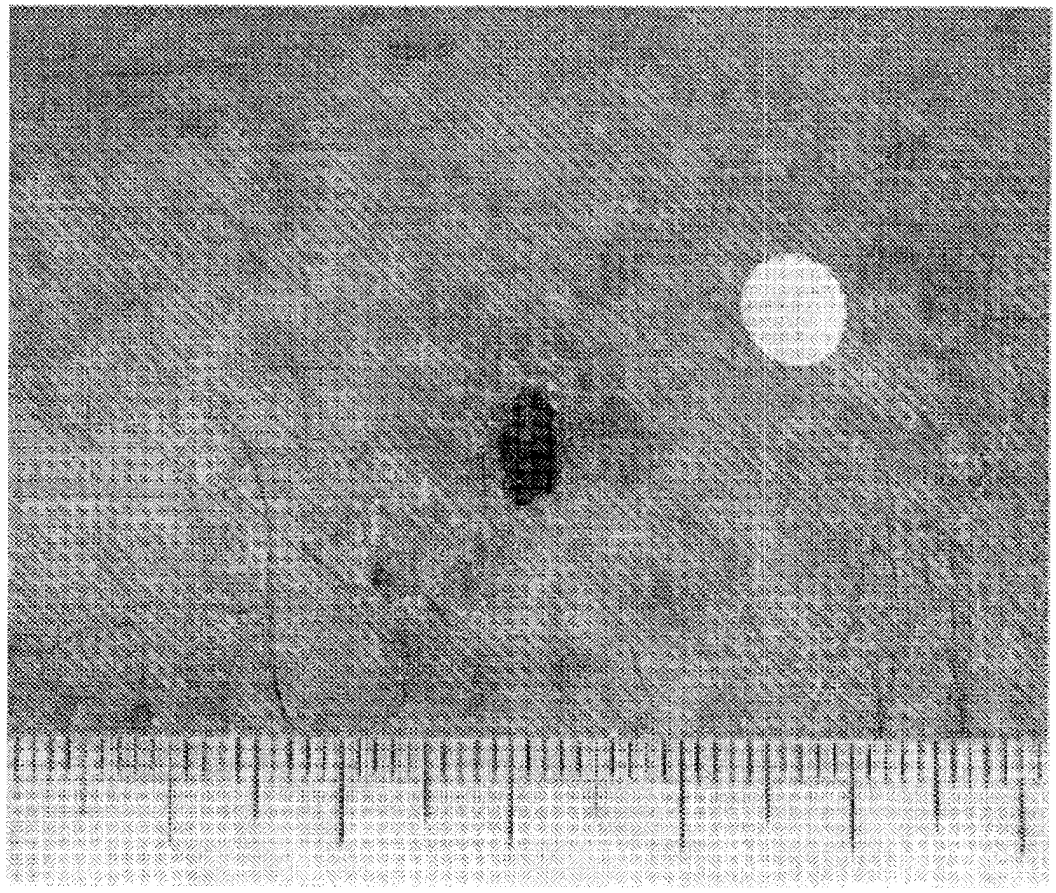
ФИГ. 32



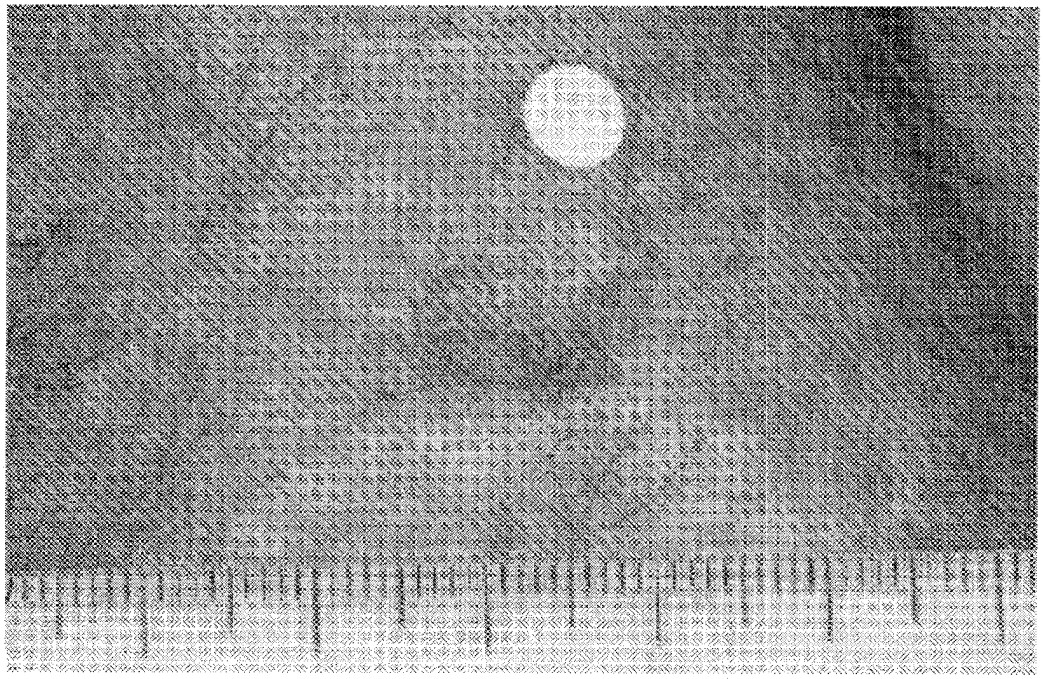
ФИГ. 33



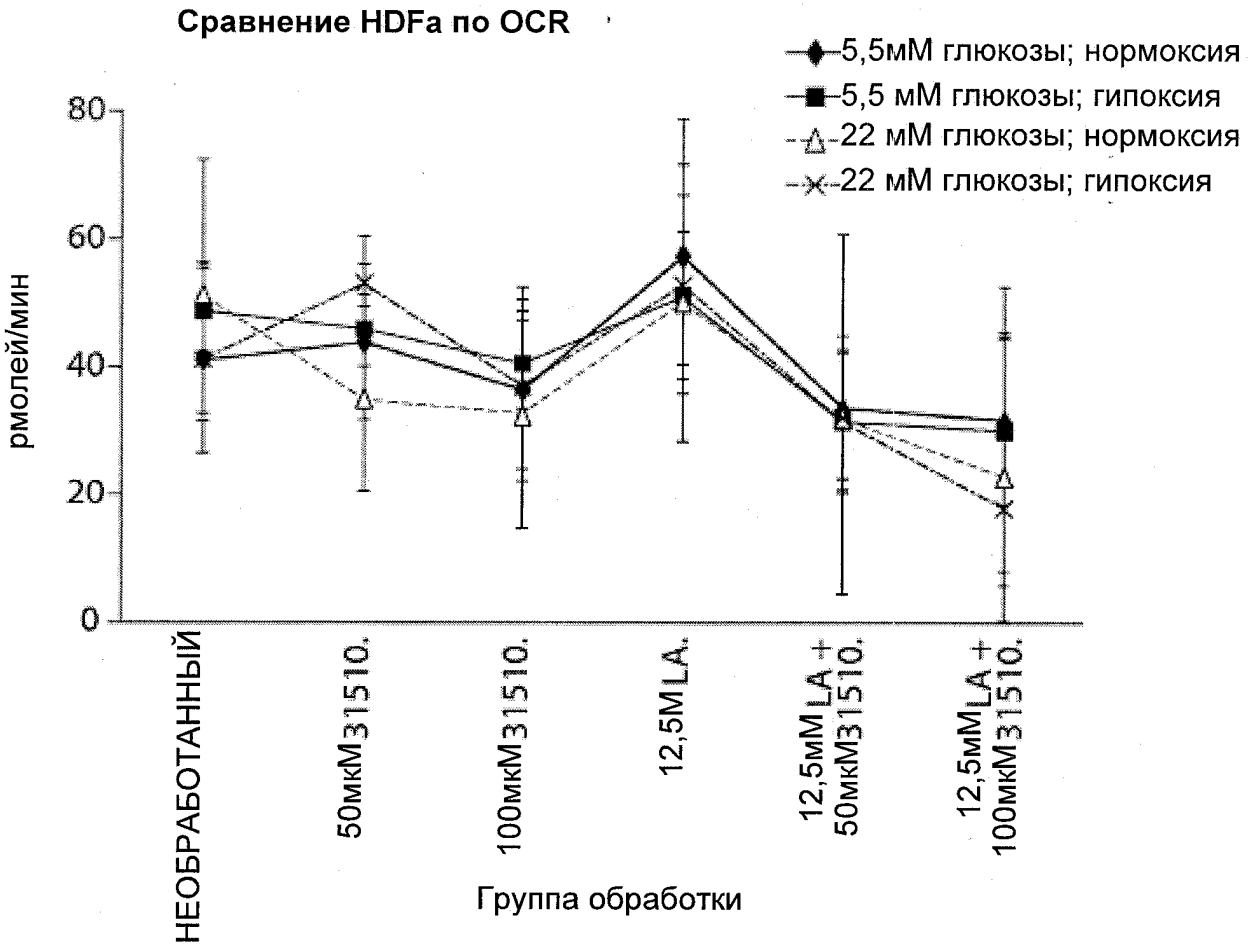
ФИГ. 34



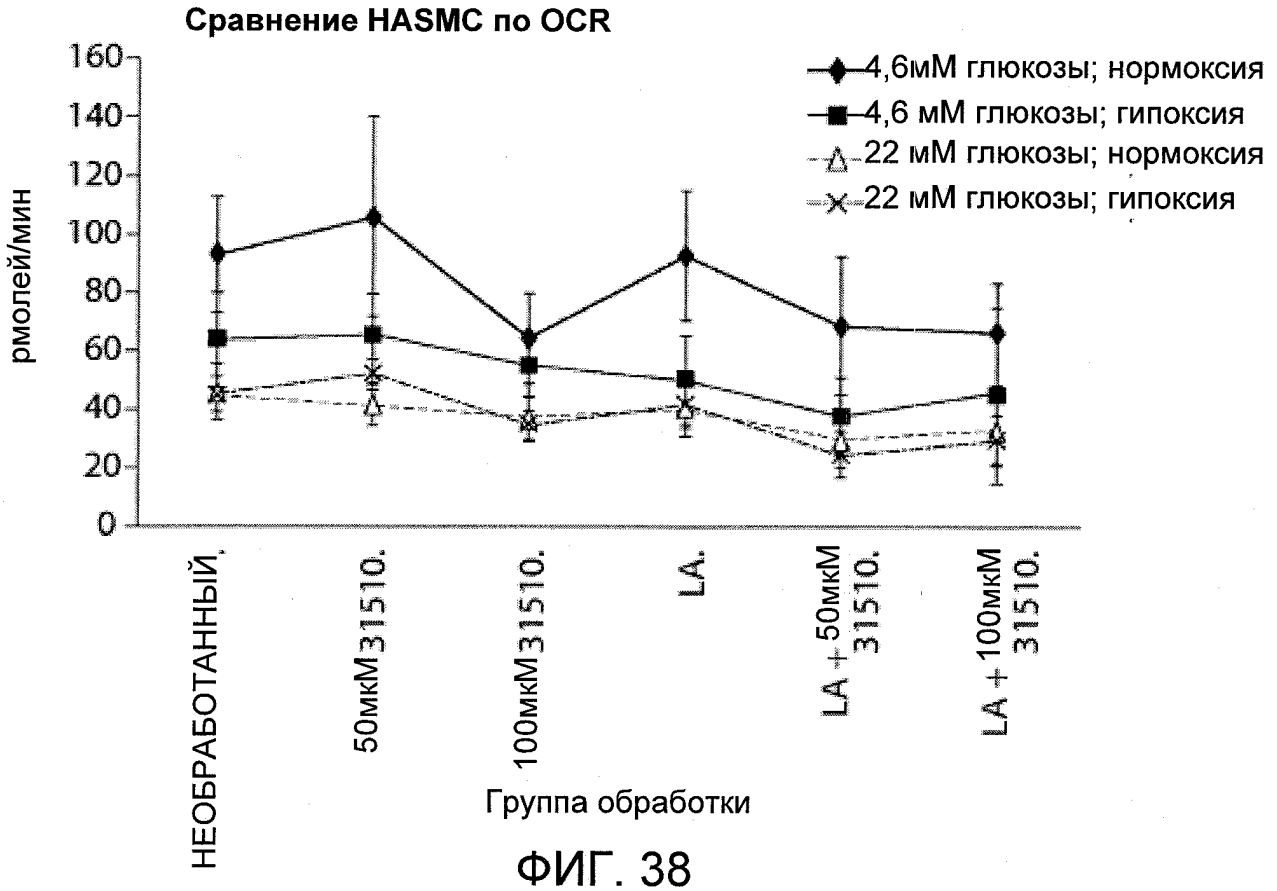
ФИГ. 35



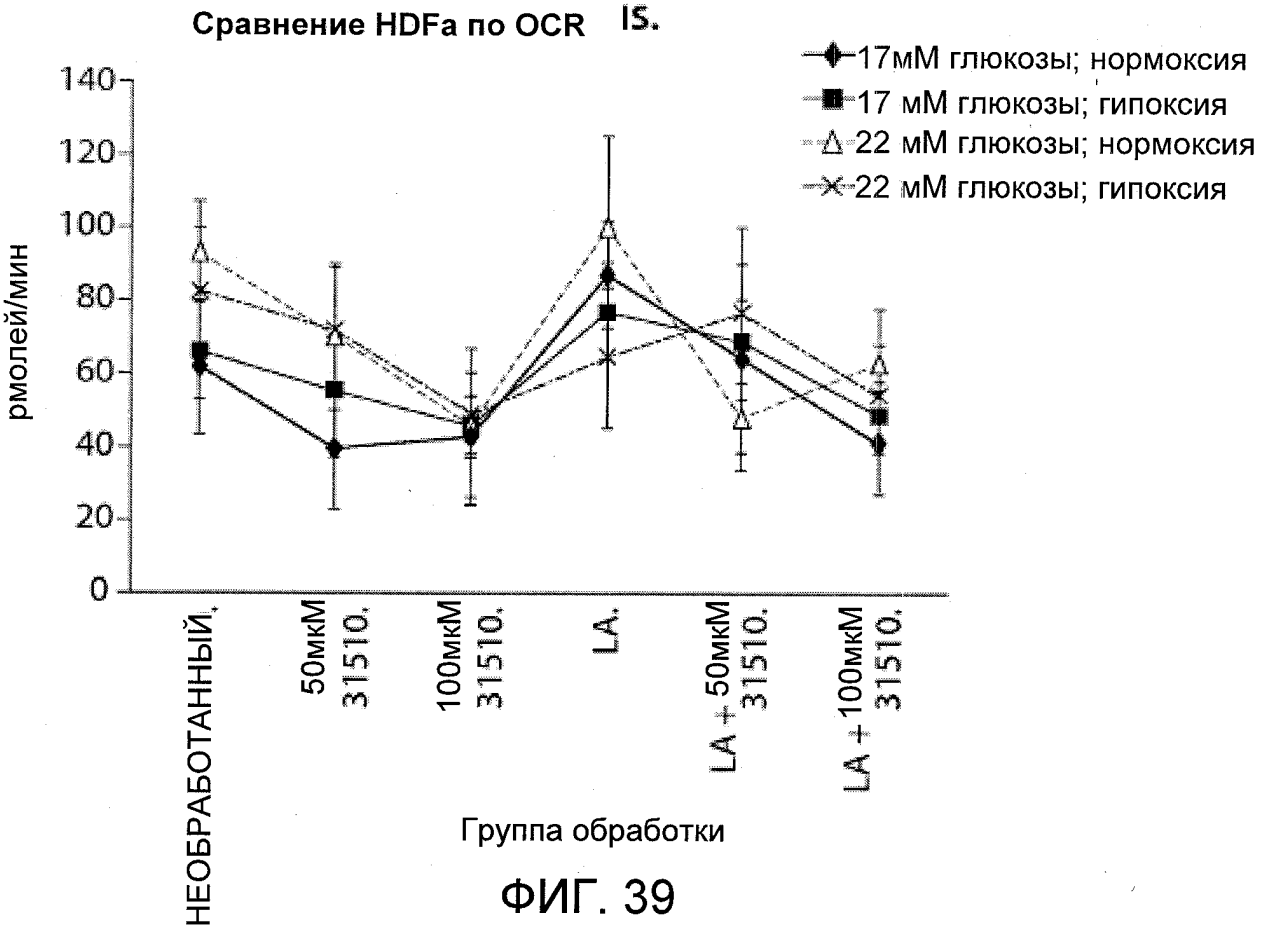
ФИГ. 36


Сравнение HDFa по OCR
5,5мМ глюкозы; нормоксия
5,5 мМ глюкозы; гипоксия
22 мМ глюкозы; нормоксия
22 мМ глюкозы; гипоксия
рмолей/мин
80
60
40
20
0
НЕОБРАБОТАННЫЙ
50мкМ31510.
100мкМ31510.
12,5МLA.
12,5мМLA + 50мкМ31510.
12,5мМLA + 100мкМ31510.
Группа обработки

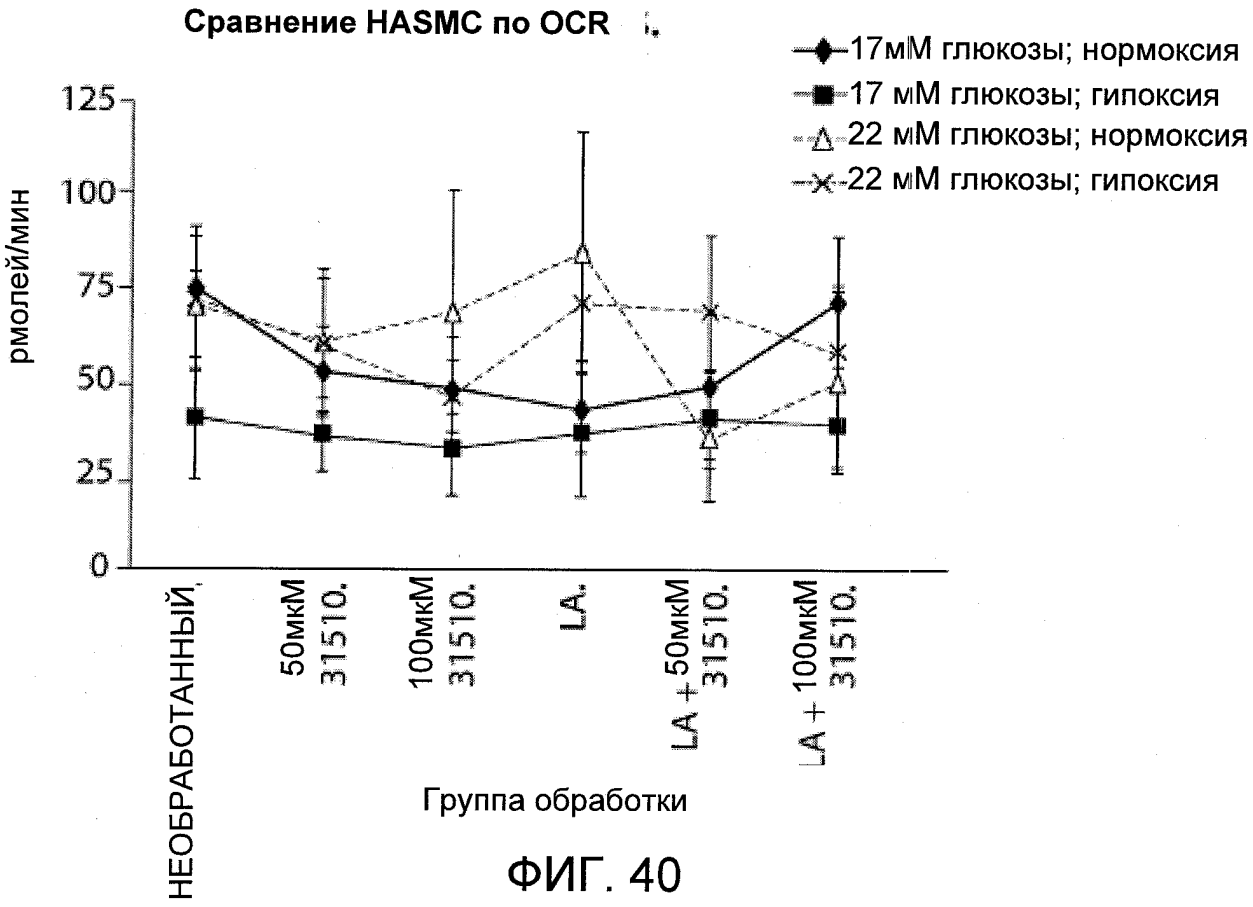
ФИГ. 37


Сравнение HASMC по OCR
4,6мМ глюкозы; нормоксия
4,6 мМ глюкозы; гипоксия
22 мМ глюкозы; нормоксия
22 мМ глюкозы; гипоксия
рмолей/мин
160
140
120
100
80
60
40
20
0
НЕОБРАБОТАННЫЙ.
50мкМ31510.
100мкМ31510.
LA.
LA + 50мкМ 31510.
LA + 100мкМ 31510.
Группа обработки

ФИГ. 38


Сравнение HDFa по OCR
17мМ глюкозы; нормоксия
17 мМ глюкозы; гипоксия
22 мМ глюкозы; нормоксия
22 мМ глюкозы; гипоксия
рмолей/мин
140
120
100
80
60
40
20
0
НЕОБРАБОТАННЫЙ
50мкМ 31510.
100мкМ 31510.
LA.
LA + 50мкМ 31510.
LA + 100мкМ 31510.
Группа обработки

ФИГ. 39


Сравнение HASMC по OCR
17мМ глюкозы; нормоксия
17 мМ глюкозы; гипоксия
22 мМ глюкозы; нормоксия
22 мМ глюкозы; гипоксия
рмолей/мин
125
100
75
50
25
0
НЕОБРАБОТАННЫЙ
50мкМ 31510.
100мкМ 31510.
LA.
LA + 50мкМ 31510.
LA + 100мкМ 31510.
Группа обработки

ФИГ. 40