



(12) SØKNAD

(11) 20190192

(13) A1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/351 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

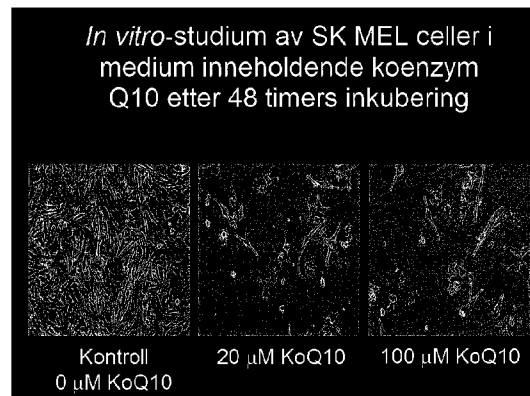
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20190192	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.01.21 PCT/US2005/001581
(22)	Inng.dag	2019.02.12	(85)	Videreføringsdag	2019.02.12
(24)	Løpedag	2005.01.21	(30)	Prioritet	2004.01.22, US, 60/538,319
(41)	Alm.tilgj	2006.10.23			
(62)	Avdelt fra	20160597, med inndato 2016.04.12			
(71)	Innehaver	University of Miami, 1475 NW 12th Avenue, Suite 2012, FL33136 MIAMI, USA			
(72)	Oppfinner	Sung Lan Hsia, 13701 SW 72nd Avenue, FL33158 MIAMI, USA Niven Rajin Narain, 850 N Miami Avenue, Apt 1607 W, FL33136 MIAMI, USA Jie Li, 69-04 N Kendall Dr #F307, FL33156 MIAMI, USA Kathryn J. Russell, 3871 Boca Pointe Dr, FL34238 SARASOTA, USA Karrune V. Woan, 1516 Red Pine Trail, FL33414 WELLINGTON, USA Indushekhar Persaud, 16830 SW 240th Street, FL33031 HOMESTEAD, USA			
(74)	Fullmektig	HÅMSØ PATENTBYRÅ AS, Postboks 171, 4301 SANDNES, Norge			

(54)	Benevnelse	Topisk koenzyne Q10-formuleringer og anvendelse derav
(57)	Sammendrag	

Topiske formuleringer av KoQ10 reduserer hastigheten av tumorvekst i et animalsk individ. I forsøkene beskrevet heri viste KoQ10 økning av hastigheten av apoptose i en kultur av hudcancer, men ikke normale celler. Videre viste behandlingen av tumorbærende dyr med en topisk formulering av KoQ10 dramatisk reduksjon av tumorvekst i dyrene.



TOPISK KOENZYME Q10-FORMULERINGER OG ANVENDELSE DERAU

Foreliggende oppfinnelse angår farmasøytiske preparater omfattende koenzym Q10 (KoQ10) og metoder for anvendelse av KoQ10 for behandling av cancer, selektiv reduksjon av cancercellevekst, induksjon av apoptose i cancerceller og inhibering av tumormediert angiogenese.

Cancer er i dag en av de ledende dødsårsaker i de utviklede land. Selv om nyere forskning enormt har økt vår forståelse når det gjelder mange av de molekylære mekanismer for tumorigenese og har gitt tallrike nye veier for behandling av cancere, forblir standardbehandlinger for de fleste malignanser generelt reseksjon, kjemoterapi og radioterapi. På tross av økende vellykkethet forårsaker hver av disse behandlinger fremdeles tallrike uønskede bivirkninger. For eksempel resulterer kirurgi i smerte, traumatisk skade på sunt vev og arrdannelse. Radioterapi og kjemoterapi forårsaker kvalme, immunsuppresjon, gastrisk ulcerering og sekundær tumorigenese.

US6582723 B2 beskriver en oralt inntatt sammensetning som omfatter «tre essensielle ingredienser», nemlig Omega-3-fettsyrer, polysakkariddiett fibre og koenzym Q10.

US2002156302 A1 omtaler prosesser for stereospesifikk syntese av koenzym Q10.

US2002039595 A1 beskriver et oralt liposomalt leveringssystem for biologisk aktive midler inkludert medikamenter, ernæringstilskudd, vitaminer, mineraler, enzymer, hormoner, proteiner og polypeptider.

Lockwood et al.: Progress on Therapy of Breast Cancer with Vitamin Q₁₀ and the Regression of Metastases”, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Academic Press Inc. Orlando, FL, US, Vol. 212, no. 1, 1995, side 172-177 beskriver oral administrering av koenzym Q10 til tre subjekter som lider av brystcancer, med en dose på 390 mg.

Foreliggende oppfinnelse angår den oppdagelse at topiske formuleringer av KoQ10 kan redusere hastigheten for tumorvekst i et animalindiv. I de her beskrevne forsøk ble KoQ10 påvist å øke hastigheten for apoptose i en kultur av hudcancer celler, men ikke normalceller. Videre ble behandlingen av tumorbærende dyr med en topisk formulering av KoQ10 påvist dramatisk å redusere hastigheten for tumorvekst i dyrene.

KoQ10 som formuleres for oral avlevering har tidligere vært benyttet som et diettsupplement. Oralt administrert KoQ10 har imidlertid vært påvist å akkumulere i leveren og redusere dens systemiske tilgjengelighet. Antitumorresponser observert med topisk applikert KoQ10 kan henge sammen med dens høyere biotilgjengelighet sammenliknet med diettsupplementformer av KoQ10.

I henhold til dette angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å redusere hastigheten av tumorcellevekst eller øke hastigheten for apoptose i tumorceller i et individ. Metoden inkluderer å tilveiebringe et individ med et antall tumorceller og til individet å administrere et preparat omfattende en effektiv mengde av KoQ10 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

I et ytterligere aspekt angår oppfinnelsen et preparat omfattende en effektiv mengde av KoQ10 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

I en foretrukket utførelsesform er preparatet en topisk formulering av KoQ10 som inkluderer minst rundt 0,01 vektprosent KoQ10 og opptil 30 vektprosent KoQ10, og en bærer som er egnet for å avlevere KoQ10 topisk. Fortrinnsvis omfatter det farmasøytiske preparat som aktiv bestanddel KoQ10, og en farmasøytisk akseptabel bærer. Preparatet omfatter koenzym Q10, fosfolipon 90, glyserol, butylert hydroksytoluen (BHT), etanol, middelskjedede triglycerider (MCT), og lavendel. Fortrinnsvis er fosfolipon 90 fosfolipon 90G og/eller fosfolipon 90H.

I en foretrukket utførelsesform omfatter det farmasøytiske preparat minst rundt 0,01 til rundt 30 vektprosent koenzym Q10. Helst omfatter det farmasøytiske preparat mellom rundt 1 og rundt 25 vektprosent koenzym Q10.

I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en metode for å behandle en cancerpasient omfattende:

til en pasient som trenger det å administrere et preparat omfattende en terapeutisk effektiv mengde koenzym Q10;

å bringe en tumorcelle i kontakt med preparatet for å oppnå lysing av tumorcel-

len;

for derved å behandle cancerpasienten.

Fortrinnsvis omfatter det farmasøytiske preparat minst rundt 0,01 og opp til rundt 30 vektprosent koenzym Q10, helst omfatter preparatet rundt 1 til rundt 25 vektprosent koenzym Q10.

I en annen foretrukket utførelsesform blir det farmasøytiske preparat formulert i en topisk krem med eventuelle, transdermale forsterkere.

I andre foretrukne utførelsesformer blir en terapeutisk effektiv mengde av koenzym Q10-preparatet administrert med ett eller flere, kjemoterapeutiske midler. Disse kjemoterapeutiske midler kan koadministreres, administreres før eller administreres etter koenzym Q10. Ikke-begrensende eksempler på kjemoterapeutiske midler inkluderer, men er ikke begrenset til: cyklofosamid (CTX, 25 mg/kg/dag, *p.o.*), taksaner (paklitaksel eller docetaksel), busulfan, cisplatin, cyklofosamid, metotreksat, daunorubicin, doksorubicin, melfalan, kladribin, vinkristin, vinblastin og klorambucil.

I andre, foretrukne utførelsesformer inhiberer det farmasøytiske preparat, koenzym Q10 preparatet, tumorcelleveksten i et individ og metoden omfatter administrering til individet av et farmasøytisk preparat omfattende en terapeutisk effektiv mengde av KoQ10. Fortrinnsvis omfatter den terapeutiske effektive mengde av koenzym Q10 i det farmasøytiske preparat mellom rundt 0,01 og 30 vektprosent koenzym Q10. Inhibering av tumorcelleveksten henviser til en eller flere av de følgende effekter:

(1) inhibering i en viss grad av tumorvekst, inkludert (i) sinking og (ii) fullstendig vekststans;

(2) reduksjon i antallet tumorceller;

(3) opprettholdelse av tumorstørrelse;

(4) reduksjon av tumorstørrelsen;

(5) inhibering, inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon, av tumorcelleinfiltrering i perifere organer;

(6) inhibering inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon, av metastase;

(7) forsterkning av anti-tumor immunresponsen som kan resultere i (i) opprettholdelse av tumorstørrelsen, (ii) reduksjon av tumorstørrelsen, (iii) sinking av veksten av en tumor, (iv) reduksjon, sinking eller prevensjon av invasjon, og/eller

(8) lindring, til en viss grad, av alvoret av et antall på en eller flere symptomer assosiert med forstyrrelsen.

I en annen utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å inducere apoptose selektivt i en tumorcelle der metoden omfatter administrering av et farmasøytisk preparat omfattende koenzym Q10 som målt i standardanalyser. Fortrinnsvis omfatter det farmasøytiske preparat minst rundt 0,01 og opp til 30 vektprosent koenzym Q10. Metoder for å måle apoptose inkluderer, men er ikke begrenset til, mitokondrial-membranfargeanalyse og/eller Annexin-VPE analyser. I en foretrukket utførelsesform inducerer det farmasøytiske preparat apoptose i minst rundt 30 % av tumorcellene målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-VPE analyse. Fortrinnsvis inducerer det farmasøytiske preparat apoptose i rundt 60 % av tumorcellene, helst rundt 75 % og aller helst rundt 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 og 100 % av tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargeanalyse og/eller Annexin-VPE analyse.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å inhibere angiogenese i en tumor der metoden omfatter å bringe tumoren i kontakt med et farmasøytisk preparat omfattende koenzym Q10. Fortrinnsvis omfatter det farmasøytiske preparat minst rundt 0,01 og opp til 30 vektprosent koenzym Q10.

Ytterligere anvendelser for de foreliggende forbindelser inkluderer bruk ved behandling av aterosklerose, inflammasjon, og som antiangiogenisk middel, særlig for behandling av cancere og særlig faste cancere som cancere i lunge, bryst, lever, hjerne eller andre vev.

Hvis ikke annet er sagt har alle tekniske uttrykk som benyttes her, de samme betydninger slik de vanligvis forstås av fagmannen på det området oppfinnelsen hører til. Generelle definisjoner av medisinske termer kan finnes i Thomas Lathrop Stedman, Stedman's Medical Dictionary, Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Alle publikasjoner, patentsøknader, patenter og andre referanser som nevnes her anses i sin helhet som del av foreliggende oppfinnelse. Hvis det foreligger konflikter vil foreliggende spesifikasjon inkludert definisjoner, være bestemmende. De spesielle utførelsesformer som er diskutert nedenfor er kun illustrerende og skal ikke anses som begrensende.

Andre aspekter ved oppfinnelsen er beskrevet *infra*.

Foreliggende oppfinnelse beskrives spesielt i de vedlagte krav. De ovenfor nevnte og ytterligere fordeler ved oppfinnelsen vil forstås bedre under henvisning til den følgende beskrivelse i forbindelse med de vedlagte figurer, der:

- Figur 1 er en serie mikrofotografier som viser effekten av KoQ10 på human melanomceller (SKMEL28) i en *in vitro*-kultur;
- Figur 2 er en graf som viser at KoQ10 reduserer proliferering av en human melanomcellelinje (SKMEL28) i en 36 timers *in vitro*-kultur;
- 5 Figur 3 er en graf som viser at KoQ10 reduserer proliferering av en human melanomcellelinje (SKMEL28) i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 4 er en graf som viser at vehikkelkontrollen ikke reduserer prolifereringen av en human, melanom cellelinje (SKMEL28) i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 5 er en graf som sammenlikner effekten av KoQ10 og apoptose mellom human, melanom og neonatale fibroblaster i en *in vitro*-kultur;
- 10 Figur 6 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av skvamøse karsinomceller i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 7 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av humane neonatale fibroblaster i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- 15 Figur 8 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av humane neonatale keratinocytter i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 9 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en brystadenokarsinomcellelinje (MCF-7) i en 48 timers *in vitro*-kultur. MCF-7-cellelinjen uttrykker WNT7B-onkogenet og inneholder Tx-4-onkogenet;
- 20 Figur 10 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en brystadenokarsinomcellelinje (MCF-7) i en 72 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 11 er et fotografi som viser induserte tumorer i kontroll- og KoQ10-behandlede mus etter behandling med en topisk formulering av KoQ10 i 30 dager;
- Figur 12 er et fotografi som viser induserte tumorer i kontroll- og KoQ10-behandlede mus etter behandling med en topisk formulering av KoQ10 i 30 dager;
- 25 Figur 13 er et fotografi som viser induserte tumorer skåret ut fra kontroll- og KoQ10-behandlede mus;

- Figur 14 er en graf som viser effekten av KoQ10-administrering på tumorstørrelse på mus behandlet med KoQ10 eller kontroll i 30 dager. Midlere tumormasse for kontrollgruppen versus behandlingsgruppen sank med 52,3 henholdsvis 54,0 %;
- 5 Figur 15 er en serie av mikrofotografier som viser effekten av KoQ10 på human-brystadenokarsinomceller (SK-BR-3) i en *in vitro*-kultur. SK-BR-3-cellelinjen overuttrykker Her2/c-erb-2-genene, genprodukt (ATCC);
- Figur 16 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (SK-BR-3) i en 48 timers *in vitro*-kultur. SK-BR-3-cellelinjen overuttrykker Her2/c-erb-2-genene, genprodukt (ATCC);
- 10 Figur 17 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (SK-BR-3) i en 72 timers *in vitro*-kultur. SK-BR-3-cellelinjen overuttrykker Her2/c-erb-2-genene, genprodukt (ATCC);
- Figur 18 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (MDA-MB-468) i en 48 timers *in vitro*-kultur. MDA-MB-468-cellelinjen har en mutasjon i p53-genet (ATCC);
- 15 Figur 19 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (MDA-MB-468) i en 72 timers *in vitro*-kultur. MDA-MB-468-cellelinjen har en mutasjon i p53-genet (ATCC);
- Figur 20 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (BT-20) i en 48 timers *in vitro*-kultur. BT-20-cellelinjen uttrykker WNT7B- og WNT3-onkogenet (ATCC);
- 20 Figur 21 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human-brystadenokarsinomcellelinje (BT-20) i en 72 timers *in vitro*-kultur. BT-20-cellelinjen uttrykker WNT7B- og WNT3-onkogenet (ATCC);
- 25 Figur 22 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en humanhepatocellulær karsinomcellelinje (Hep 3B) i en 48 timers *in vitro*-kultur;
- Figur 23 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human hepatocellulær karsinomcellelinje (Hep 3B) i en 72 timers *in vitro*-kultur;

Figur 24 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human osteosarkomcellelinje (143B) i en 48 timers *in vitro*-kultur;

Figur 25 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human osteosarkomcellelinje (143B) i en 72 timers *in vitro*-kultur;

5 Figur 26 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human prostatisk adenokarsinomcellelinje (PC-3) i en 48 timers *in vitro*-kultur;

Figur 27 er en graf som viser at KoQ10 reduserer prolifereringen av en human prostatisk adenokarsinomcellelinje (PC-3) i en 72 timers *in vitro*-kultur;

10 Figur 28 er en graf som viser effekten av KoQ10 på mitokondrialpolarisering (en apoptoseindikator) av en human prostatisk adenokarsinomcellelinje (PC-3) i en 24 timers *in vitro*-kultur. PC-3-cellekulturene ble behandlet med Q10 i konsentrasjoner på 0,05, 0,1 og 0,2 mM i 24 timer og så behandlet med JC-1 i en mengde av 10 mikrogram/ml i 30 min. opptak, og nivåer av grønn fluoressens ble målt i et strømningscytometer, FL1 (grønn fluorisering). Merk: en
15 signifikant økning i den grønne fluoressens ble observert i 0,2 mM Q10 behandlede celler (gul graf); og

Figurene 29A og 29B er fotografier som viser inhiberingen av tumormediert angiogenese i vev med et preparat omfattende KoQ10 (figur 29B) sammenliknet med en kontroll i fravær av et preparat omfattende KoQ10.

20 Oppfinnelsen tilveiebringer preparater og metoder for å redusere hastigheten av tumorcellevekst eller økning av hastigheten av tumorcelleapoptose. Preparater ifølge oppfinnelsen inkluderer som anti-tumormiddel en terapeutisk effektiv mengde KoQ10 og en bærer. Et foretrukket preparat ifølge oppfinnelsen er en topisk formulering av KoQ10 omfattende minst rundt 1 % KoQ10 og en bærer som letter topisk avlevering av KoQ10. Et mest foret-
25 rukkhet preparat ifølge oppfinnelsen er en topisk formulering av KoQ10 omfattende mellom rundt 1 og 15 % KoQ10 og en bærer som letter topisk avlevering av KoQ10. Metoder ifølge oppfinnelsen for å avlive en tumorcelle eller redusere dens veksthastighet inkluderer å bringe cellen i kontakt med en effektiv konsentrasjon av KoQ10.

30 De nedenfor beskrevne, foretrukne utførelsesformer illustrerer tilpasninger av disse preparater og metoder. Ikke desto mindre vil, fra beskrivelsen av disse utførelsesformer, andre aspekter ved oppfinnelsen være klare og/eller kunne utføres basert på den gitte beskrivelse.

Før beskrivelsen skal diskuteres og beskrives skal det være klart at oppfinnelsen ikke er begrenset til de spesielle strukturer, prosesstrinn eller materialer som er beskrevet her men også omfatter ekvivalenter derav slik dette vil erkjennes av fagfolk på det relevante område. Det skal også være klart at terminologien som benyttes her benyttes for å beskrive spesielle utførelsesformer og skal ikke anses begrensende.

Definisjoner

Ifølge oppfinnelsen og som benyttet her skal de følgende uttrykk defineres med de følgende betydninger, hvis ikke annet er sagt.

Som benyttet her inkluderer entallsformer også flertallsformer hvis ikke konteksten klart sier noe annet.

Som benyttet her er en "farmasøytisk akseptabel" komponent en som er egnet for bruk med mennesker og/eller dyr uten urimelige, ugunstige bivirkninger (som toksisitet, irritasjon og allergisk respons), vurdert mot et rimelig fordel/risikoforhold.

Som benyttet her henviser uttrykket "sikker og terapeutisk effektiv mengde" til mengde av en komponent som er tilstrekkelig til å gi en ønsket, terapeutisk respons uten urimelige, ugunstige bivirkninger (som toksisitet, irritasjon og allergisk respons) vurdert i forhold til et rimelig fordel/risikoforhold, benyttet ifølge oppfinnelsen. Med "terapeutisk effektiv mengde" menes en mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som er effektiv for å gi den ønskede, terapeutiske respons. For eksempel en mengde som er effektiv for å forsinke veksten eller for å forårsake at en cancer, enten et sarkom eller lymfom, eller å krympe canceren eller forhindre metastase. Den spesifikke sikre og effektive mengde eller terapeutiske effektive mengde vil variere med faktorer som den spesielle tilstand som behandles, den fysiske tilstand av pasienten, typen pattedyr eller dyr som behandles, behandlingens varighet, arten av parallelt løpende terapi (hvis noen) og de spesifikke formuleringer som benyttes og strukturen for forbindelsene eller deres derivater.

Som benyttet her inkluderer et "farmasøytisk salt", men er ikke begrenset til, mineral- eller organiske salter av

basiske rester som aminer; alkali- eller organiske salter og sure rester som karboksylsyrer. Fortrinnsvis fremstilles saltene ved bruk av organiske eller uorganiske syrer. De foretrukne syresalter er klorider, bromider, sulfater, nitrater, fosfater, sulfonater, formater, tartrater, maleater, citrater, benzoater, salicylater, askorbater og liknende. Det mest foretrukne salt er hydrokloridsaltet.

Som benyttet her henviser uttrykket "cancer" til alle typer cancer eller neoplasmer eller malignante tumorer som finnes i pattedyr, inkludert, men ikke begrenset til, leukemier, lymfomer, melanomer, karsinomer og sarkomer. I foretrukne utførelsesformer benyttes KoQ10-preparater for behandling av forskjellige typer brystcancer, prostatacancer, levercancer og bencancer. Imidlertid er behandling ved bruk av KoQ10-preparatet ikke be-

egrenset til disse typer cancere.

Eksempler på cancere er cancere i hjerne, bryst, pankreas, cervix, kolon, hode og nakke, nyre, lunge, ikke-små cellelunge, melanomer, mesotelioma, ovarie, sarkoma, mage, uterus og medulloblastoma. Som benyttet her benyttes uttrykkene "cancer", "neoplasme" og "tumor" om hverandre og i enten entall eller flertall og refererer til celler som har undergått en malignant transformasjon som gjør dem patologiske mot vertsorganismen. Primære cancerceller (det vil si celler oppnådd fra nær setet av malignant transformasjon) kan lett atskilles fra ikke-cancerøse celler ved veletablerte teknikker, særlig histologisk undersøkelse. Definisjonen av en cancercelle slik den benyttes her inkluderer ikke bare en primær cancercelle men en hvilken som helst celle avledet fra en cancercelleforløper. Dette inkluderer metastaserte cancerceller og *in vitro*-kulturer og cellelinjer avledet fra cancerceller. Når det henvises til en type cancer som normalt manifesteres som en fast tumor er en "klinisk detekterbar" tumor en som er detekterbar på basis av tumormasse; for eksempel ved prosedyrer som CAT scan, MR avbildning, røntgen, ultralyd eller palpasjon, og/eller som er detekterbart på grunn av ekspresjonen av ett eller flere cancerspesifikke antigener i en prøve oppnådd fra en pasient.

Uttrykket "sarkom" henviser generelt til en tumor som består av en substans lik det embryoniske bindevev og består generelt av lukkede, pakkede celler som er innleiret i en fibrillær eller homogen substans. Eksempler på sarkomer som kan behandles ifølge oppfinnelsen og eventuelt en potensiator og/ eller et kjemoterapeutisk middel inkluderer, men er ikke begrenset til, kondrosarkoma, fibrosarkoma, lymfosarkoma, melano-sarkoma, myk-sosarkoma, osteosarkoma, Abemethys-sarkoma, adiposesarkoma, liposarkoma, alveolær mykdel-sarkoma, ameloblastisk sarkoma, botryoidsarkoma, kloromasarkoma, koriokarsinoma, embryonalsarkoma, Wilms tumorsarkoma, endometrial sarkoma, stromalsarkoma, Ewings sarkoma, fasialsarkoma, fibroblastisk sarkoma, kjempecellesarkoma, granulocytisk sarkoma, Hodgkins sarkoma, idiopatisk multippel pigmentert hemorragisk sarkoma, immunoblastisk sarkoma av B-celler, lymfoma, immunoblastisk sarkoma av T-celler, Jensens sarkoma, Kaposi sarkoma, Kupffer celled sarkoma, angiosarkoma, leukosarkoma, malignant mesenkymoma sarkoma, parosteal sarkoma, retikulocytisk sarkoma, Rous sarkoma, serocytisk sarkoma, synovial sarkoma og telangiektaltisk sarkoma.

Uttrykket "melanom" skal bety en tumor som skyldes det melanocystiske system i hud og andre organer. Melanomer som kan behandles med preparater ifølge oppfinnelsen og eventuelt en potensiator og/eller et annet, kjemoterapeutisk middel inkluderer, men er ikke begrenset til for eksempel akral-lentiginøs melanom, amelanotisk melanom, benign juvenil melanom, Cloudmans melanom, S91 melanom, Harding-Passey melanom, juvenil melanom, lentigo maligna melanom, malignant melanom, nodulær melanom, subungal melanom og overflateutsprende melanom.

Uttrykket "karsinom" henviser til en malignant, ny vekst av epitelceller med tendens til å infiltrere det omgivende vev og gi opphav til metastaser. Karsinomer som kan behandles med preparatene ifølge oppfinnelsen og eventuelt en potensiator og/eller et kjemoterapeutisk middel inkluderer, men er ikke begrenset til for eksempel asinær karsinom, asinøs karsinom, adenocystisk karsinom, adenoidcystisk karsinom, karsinoma adenomatosum, karsinom av adrenal korteks, alveolær karsinom, alveolær cellekarsinom, basalcellekarsinom, karsinoma basocellulær, basaloid karsinom, basoskvamøs cellekarsinom, bronkioalveolær karsinom, bronkiolær karsinom, bronkogenisk karsinom, cerebriform karsinom, kolangiocellulær karsinom, korionisk karsinom, kolloid karsinom, komedokarsinom, korpus karsinom, cribiform karsinom, karsinoma en cuirasse, karsinoma kutaneum, sylindrisk karsinoma, sylindrisk cellekarsinom, kanalkarsinom, karsinoma durum, embryonal karsinom, encefaloid karsinom, epiermoid karsinom, karsinoma epiteliale adenoider, eksofytisk karsinom, karsinoma ex ulcere, karsinoma fibrosum, gelatin i form karsinom, gelatinøs karsinom, kjempecellekarsinom, karsinoma gigantocellulare, glandulær karsinom, granulosa cellekarsinom, hårmatriks karsinom, hematoidkarsinom, hepatocellulær karsinom, Hurthle cellekarsinom, hyalinkarsinom, hypermefroidkarsinom, infantil embryonal karsinom, karsinom in situ, intraepidermal karsinom, intraepitelial karsinom, Krompechers karsinom, Kulchitzky-cellekarsinom, stor-celle karsinom, lentikulært karsinom, karsinoma lentikulare, lipomatøs karsinom, lymfoepitelial karsinom, karsinoma medullare, medulær karsinom, melanotisk karsinom, karsinoma molle, musinøs karsinom, karsinoma muciparum, karsinoma mukocellulare, mukoepidermoidkarsinom, karsinoma mukosum, mukøs karsinom, karsinoma myksomatoder, nasofaryngeal karsinom, havrecellekarsinom, karsinoma ossifikans, osteoidkarsinom, papillær karsinom, periportalkarsinom, preinvasiv karsinom, prikkcellekarsinom, pultaseøs karsinom, renalcellekarsinom i nyre, reservecellekarsinom, karsinoma sarkomatoder, schneiderkarsinom, skirrøs karsinom, karsinoma skroti, signet-ring cellekarsinom, karsinoma simpleks, småcelle karsinom, solanoid karsinom, sferoid cellekarsinom, spindelcellekarsinom, karsinoma spongiose, skvamøs karsinom, skvamøs cellekarsinom, strengkarsinom, karsinoma telangiektatikum, karsinoma

telangiektoder, transisjonell cellekarsinom, karsinoma tuberosum, tuberøs karsinom, ver-
rukøs karsinom og karsinoma villosum.

Ytterligere cancere som kan behandles med preparatene ifølge oppfinnelsen, inkluderer
for eksempel Hodgkins sykdom, ikke-Hodgkins lymfom, multippel myelom, neuroblastom,
5 bryst-, ovarie- eller lungecancer, rhabdomyosarkom, primær trombocytose, primær mak-
roglobulinemi, små-celle lungetumorer, primære hjernetumorer, magecancer, koloncan-
cer, malignant pankreatisk insulanom, malignant karsinoid, urinblærecancer, premalignan-
te hudlesjoner, testikkelcancer, lymfomer, tyrodcancer, neuroblastom, øsofageal cancer,
genitourinær kanalcancer, malignant hyperkalsemi, cervikal cancer, endometrial cancer,
10 adrenal kortikal cancer og prostatacancer.

"Diagnostisk" eller "diagnostisert" betyr identifisering av nærværet eller arten av en pato-
logisk tilstand. Diagnostiske metoder skiller seg fra hverandre når det gjelder sensitivitet
og spesifisitet. "Sensitiviteten" for en diagnostisk analyse er prosentandelen av syke indi-
vider som tester positivt (prosentandel "sanne positive"). Syke individer som ikke detekte-
15 res ved analysen er "falske negative". Individer som ikke er syke og som tester negativt i
analysene angis som "sanne negative". "Spesifisiteten" for en diagnostisk analyse er 1
minus den falske positive mengden der den "falske positive" mengde er definert som an-
delen av de uten sykdom som tester positivt. Mens en spesiell, diagnostisk metode ikke
behøver å gi en definitiv diagnose av en tilstand er det tilstrekkelig hvis metoden gir en
20 positiv indikasjon som understøtter diagnosen.

Uttrykket "pasient" eller "individ" benyttes om hverandre her og henviser til et pattedyrindi-
vid som behandles der humanpasienter er foretrukket. I enkelte tilfeller finner metodene
ifølge oppfinnelsen anvendelse i forsøksdyr, veterinæranvendelser og utvikling av dyre-
modeller for sykdommen, inkludert men ikke begrenset til, gnagere som mus, rotter og
25 hamstere; og primater.

"Prøve" benyttes her i begrepets bredeste forstand. En prøve omfattende polynukleotider,
polypeptider, peptider, antistoffer og liknende, kan omfatte et kroppsfluid; en oppløselig
fraksjon av et cellepreparat eller medium hvori celler dyrkes; et kromosom, en organell
eller membran isolert eller ekstrahert fra en celle; genomisk DNA, RNA eller cDNA, poly-
30 peptider eller peptider i oppløsning eller bundet til et substrat; en celle; et vev; et vevav-
trykk; et fingeravtrykk, hud eller hår; og liknende.

"Behandling" er en intervensjon som gjennomføres med det formål å forhindre utvikling
eller endring av patologien eller symptomer på en sykdom. I henhold til dette henviser

"behandling" til både terapeutisk behandling og profylaktiske eller preventative forholdsregler. De som trenger behandling inkluderer de som allerede har forstyrrelsen så vel som de der forstyrrelsen skal forhindres. Ved tumorbehandling (for eksempel cancer) kan et terapeutisk middel direkte redusere patologien av tumorceller eller gjøre tumorcellene mer mottagelige for behandling med andre terapeutiske midler, for eksempel bestråling og/eller kjemoterapi. Som benyttet her henviser "lindret" eller "behandling" til et symptom som nærmer seg en normalisert verdi (for eksempel en verdi som oppnås hos en frisk pasient eller et individ), som for eksempel er mindre enn 50 % forskjellig fra en normalisert verdi, fortrinnsvis mindre enn 25 % og helst mindre enn 10 % forskjellig fra en normalisert verdi og som aller helst ikke signifikant skiller seg fra en normalisert verdi, bestemt ved statistiske rutinetester. For eksempel henviser "behandling av cancer" eller "tumorceller" til en eller flere av de følgende effekter:

- (1) i en viss grad å inhibere tumorvekst inkludert (i) å sinke og (ii) fullstendig stanse veksten;
- (2) reduksjon i antall tumorceller;
- (3) å opprettholde tumorstørrelse;
- (4) reduksjon i tumorstørrelsen;
- (5) inhibering, inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon, av tumorcelleinfiltrasjon i perifere organer;
- (6) inhibering, inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon, av metastase;
- (7) forsterkning av antitumorimmunrespons som kan resultere i (i) opprettholdelse av tumorstørrelse, (ii) reduksjon av tumorstørrelse, (iii) sinking av veksten av en tumor, (iv) reduksjon, sinking eller prevensjon av invasjon; og/eller
- (8) lindring, til en viss grad, av alvoret eller antallet av ett eller flere symptomer assosiert med forstyrrelsen.

Som benyttet her henviser et "lindret symptom" eller "behandlet symptom" til et symptom som nærmer seg en normalisert verdi, for eksempel mindre enn 50 %, helst mindre enn 25 % og aller helst mindre enn 10 % forskjellig fra en normalisert verdi, aller helst ikke signifikant forskjellig fra en normalisert verdi som bestemt ved bruk av statistiske rutinetester.

Et "kjemokin" er et lite cytokin som er involvert i migrering og aktivering av celler, inkludert fagocytter og lymfocytter, og spiller en rolle i inflammatoriske responser.

Et "cytokin" er et protein som består av en celle som påvirker oppførselen til andre celler via en "cytokinreseptor" på overflaten av cellene som cytokinet påvirker. Cytokiner fremstilt av lymfocytter kalles noen ganger "lymfokiner". Cytokiner karakteriseres også som type I (for eksempel IL-2 og IFN- γ) og type II (for eksempel IL-4 og IL-10).

- 5 Med uttrykket "modulere" menes at en hvilken som helst av de nevnte aktiviteter for eksempel økes, forsterkes, agoniseres (virker som agonist), fremmes, reduseres, undertrykkes eller blokkeres eller antagoniseres (virker som agonist). Modulering kan øke aktiviteten mer enn 1, 2, 3, 5, 10 eller 100 ganger over bunnlinjeverdier. Modulering kan også redusere aktiviteten under bunnlinjeverdier.
- 10 Som benyttet her henviser uttrykket "selektiv for tumorceller" til effektene av koenzym Q10 farmasøytiske preparater, for eksempel inhibering av tumorvekst, apoptose, anti-angiogeniske effekter og som ikke er detekterbare ved applikering på normale celler slik det beskrives i detalj i eksemplene nedenfor.

KoQ10-preparater

- 15 I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen KoQ10-preparater for behandling av cancer. Fortrinnsvis omfatter preparatene minst rundt 1 til rundt 25 vektprosent KoQ10, helst rundt 1 til rundt 20 vektprosent KoQ10. I den representative utførelsesform som beskrives i eksempeldelen nedenfor blir en topisk formulering av KoQ10 applikert på huden hos et tumorbærende dyr for å redusere veksthastigheten av tumoren. KoQ10 kan
- 20 oppnås fra Pure Prescriptions (San Diego, CA, USA) i pulverform i en hvilken som helst egnet mengde (for eksempel 1 kilo). For å avgi et KoQ10-holdig preparat kan det benyttes en hvilken som helst egnet bærer. For eksempel kan liposomer benyttes som bærere. Et eksempel på en liposomformulering består av fosfolipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT, USA), fosfolipon 90H (American Lechitin, Stanford, CT, USA), glycerol, butylert
- 25 hydroksytoluen (BHT), etanol, middelskjede triglycerider (MCT), lavendel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) og koenzym Q10 (Pure Prescriptions, San Diego, CA, USA). Et eksempel på en protokoll for å fremstille denne formulering medfører først oppløsning av 10 g fosfolipon 90H, 5 g fosfolipon 90G med 1,5 g MCT, 0,3 g BHT og 9 ml etanol ved 75°C. Deretter oppløses 12 g koenzym Q10 i blandingen. 65ml 1mM fosfatbuffer (pH 8,2), frem-
- 30 stilt med nitrogenmettet vann, 13,3 g glyserol og 50 μ L lavendel, tilsettes. Denne blanding blandes i en høyhastighetsblander ved 12 000 omdreininger per minutt for å danne en krem. Denne kremen lagres ved 4°C til bruk.

Individer

Fordi individer fra mange forskjellige arter har tumorer og er mottakelige for å få en tumor, er oppfinnelsen kompatibel med mange typer dyreindivider. En ikke-uttømmende eksempeliste på slike dyr inkluderer pattedyr som mus, rotter, kaniner, geiter, sauer, svin, hester, kveg, hunder, katter og primater som aper av forskjellige typer, samt mennesker. Disse animalindivider som er kjent for å lide fra en hudcancertumor er foretrukket for utøvelse av oppfinnelsen. Særlig er humanpasienter som lider av en hudcancertumor eller andre tumorer, egnede dyreindivider for utøvelse av oppfinnelsen. Ved å tilpasse metodene som beskrives her, til andre metoder som er kjent i medisin eller veterinærområdet (for eksempel justering av doser av administrerte substanser i henhold til vekten av individdyret), kan preparatene som benyttes ved utøvelse av oppfinnelsen, lett optimaliseres for bruk i andre dyr.

Farmasøytiske preparater og administrering til et individ

I en foretrukket utførelsesform blir preparatene omfattende KoQ10 administrert topisk. Det er foretrukket å presentere den aktive bestanddel, det vil si KoQ10, som en farmasøytisk formulering. Eksempler på preparater er beskrevet i detalj i eksemplene som følger. Den aktive bestanddel kan omfatte, for topisk administrering, fra 0,001 til rundt 20 vektprosent av formuleringen i det endelige produkt, selv om den kan omfatte helt opp til 30 vektprosent, men særlig fra rundt 1 til 20 vektprosent av formuleringen. Den topiske formulering ifølge oppfinnelsen omfatter en aktiv bestanddel sammen med en eller flere akseptable bærere og eventuelt en eller flere andre terapeutiske bestanddeler. Bæreren må være "akseptabel" dit hen at den er kompatibel med de andre bestanddeler i formuleringen og ikke skadelig for mottakeren.

Preparatene ifølge oppfinnelsen kan administreres til en pasient enten *per se* eller i farmasøytiske preparater i blanding med egnede bærere eller eksipienter. Ved behandling av en pasient som viser en forstyrrelse av interesse blir en terapeutisk effektiv mengde av ett eller flere midler som disse, administrert. En terapeutisk effektiv dose henviser til en mengde av forbindelsen som resulterer i en lindring av symptomer eller en forlengelse av overlevelsen for en pasient.

Toksisitet og terapeutisk effektivitet for slike forbindelser kan bestemmes ved farmasøytiske standardprosedyrer i cellekulturer eller ved bruk av forsøksdyr, for eksempel for å bestemme LD₅₀ (den dose som er letal for 50 % av populasjonen) og ED₅₀ (den dose som er terapeutisk effektiv i 50 % av populasjonen). Doseforholdet mellom toksisk og terapeu-

tisk effekt er den terapeutiske indeks og uttrykkes som forholdet LD_{50}/ED_{50} . Forbindelser som viser høye, terapeutiske indekser er foretrukket. Data som oppnås fra disse cellekulturanalyser og dyrestudier kan benyttes ved formulering av et område av doseringer for bruk i mennesker. Doseringen av slike forbindelser ligger fortrinnsvis innen området for sirkulerende konsentrasjoner som inkluderer ED_{50} med liten eller ingen toksisitet. Doseringen kan variere innen dette område avhengig av den doseringsform som benyttes og den benyttede administreringsvei.

For en hvilken som helst forbindelse som benyttes i oppfinnelsens metoder kan den terapeutiske effektive dose estimeres i utgangspunktet fra cellekulturanalyser. For eksempel kan en dose formuleres i dyremodeller for å oppnå et sirkulerende plasmakonsentrasjonsområde som inkluderer IC_{50} som bestemt i cellekultur. Slik informasjon kan benyttes for mer nøyaktig å bestemme brukbare doser i mennesker. Nivåer i plasma kan måles, for eksempel ved HPLC.

Den nøyaktige formulering, administreringsvei og dosering kan velges av den individuelle lege i lys av pasientens tilstand (se for eksempel Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, kapittel 1 s 1). Det skal påpekes at den ansvarlige lege vil vite hvordan og når administrering skal avsluttes, avbrytes eller justeres på grunn av toksisitet eller organdysfunksjoner. Omvendt vil den ansvarlige lege også vite hvordan behandlingen skal justeres til høyere nivåer hvis den kliniske respons ikke var tilstrekkelig (prekluderende toksisitet). Størrelsesorden av en administrert dose ved pleie av den onkogeniske forstyrrelse av interesse vil variere med alvoret av den tilstand som behandles og administreringsvei. Alvor av tilstanden kan for eksempel evalueres delvis ved prognostiske standard evalueringsmetoder. Videre vil dose og eventuell dosefrekvens også variere i henhold til alder, kroppsvekt og respons hos den individuelle pasient. Et program tilsvarende det som er beskrevet ovenfor kan benyttes i veterinær medisin.

Avhengig av den spesifikke tilstand som behandles, kan slike midler formuleres og administreres systemisk eller lokalt. Teknikker for formulering og administrering kan finnes i Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990). Egnede veier er oral, rektal, transdermal, vaginal, transmukosal eller intestinal administrering; parental avlevering inkludert intramuskulære, subkutane eller intramedullære injeksjoner, så vel som intratekale, direkte intraventrikulære, intravenøse, intraperitoneale, intranasale eller intraokkulære injeksjoner, for bare å nevne noen få.

Preparatene som beskrevet ovenfor kan administreres til et individ i en hvilken som helst egnet formulering. I tillegg til behandling med cancer med topiske formuleringer av KoQ10, kan, i andre aspekter ved oppfinnelsen, KoQ10 avgis ved andre metoder. For eksempel kan KoQ10 formuleres for parenteral avlevering, for eksempel for subkutan, intravenøs, intramuskulær eller intratumoral injeksjon. Andre metoder for avlevering, for eksempel liposomal avlevering eller diffusjon fra en innretning, impregnert med preparatet, kan benyttes. Preparatene kan administreres i en enkelt bolus, i flere injeksjoner eller ved kontinuerlig infusjon (for eksempel intravenøst eller ved peritoneal dialyse). For parenteral administrering blir preparatene fortrinnsvis formulert i en sterilisert pyrogenfri form. Preparater ifølge oppfinnelsen kan også administreres *in vitro* til en celle (for eksempel for å indusere apoptose i en cancercelle i en *in vitro*-kultur) ved ganske enkelt å sette preparatet til fluidet hvori cellen befinner seg.

Avhengig av de spesifikke tilstander som behandles kan slike midler formuleres og administreres systemisk eller lokalt. Teknikker for å formulere og å administrere kan finnes i Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg., Mack Publishing Co., Eastern, Pa. (1990). Egnede veier inkluderer oral, rektal, transdermal, vaginal, transmukosal eller intestinal administrering; parental avlevering inkludert intramuskulære, subkutane eller intramedullære injeksjoner, så vel som intratekale, direkte intraventrikulære, intravenøse, intraperitoneale, intranasale eller intraokkulære injeksjoner, for å nevne noen få.

For injeksjon kan midlene ifølge oppfinnelsen formuleres i vandige oppløsninger, fortrinnsvis i fysiologisk kompatible buffere som Hanks oppløsning, Ringers oppløsning eller fysiologisk saltbuffer. For slik transmukosal administrering benyttes penetranter som er egnet for barrieren som skal gjennomtrenges av formuleringen. Slike penetranter er velkjente i teknikken.

Bruken av farmasøytisk akseptable bærere for å formulere de her beskrevne forbindelser for utøvelse av oppfinnelsen til doser som er egnet for systemisk administrering, ligger innenfor oppfinnelsens ramme. Med riktig valg av bærer og egnet fremstillingspraksis kan preparatene ifølge oppfinnelsen og særlig de som er formulert som oppløsninger, administreres parenteralt, for eksempel ved intravenøs injeksjon. Forbindelsene kan lett formuleres ved bruk av farmasøytisk akseptable bærere som er velkjente på området til doser som er egnet for oral administrering. Slike bærere muliggjør at forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan formuleres som tabletter, piller, kapsler, væsker, geler, siruper, oppslemminger, suspensjoner og liknende, for oralt inntak hos en pasient som skal behandles.

Midler ment for administrering intracellulært kan administreres ved bruk av i og for seg kjente teknikker. For eksempel kan slike midler innkapsles i liposomer og så administreres som beskrevet ovenfor. Liposomer er sfærisk lipidbisiakt med vandig indre. Alle molekyler som er til stede i en vandig oppløsning på tidspunktet for liposomdannelsen inkorporeres i det vandige indre. Det liposomale innhold er både beskyttet mot den eksterne mikroomgivel-
 5 velse og, fordi liposomene fuserer med cellemembraner, avgis effektivt til celleytoplasma. I tillegg og på grunn av hydrofobisiteten kan små, organiske molekyler administreres direkte intracellulært.

Farmasøytiske preparater som er egnet for bruk ifølge oppfinnelsen, inkluderer preparater der de aktive bestanddeler inneholdes i en effektiv mengde for å oppnå det tilsiktede formål, se for eksempel figur 14. Bestemmelse av de effektive mengder ligger godt innenfor fagmannens kunnskapsområde, særlig i lys av den her gitte, detaljerte beskrivelse. I tillegg til de aktive bestanddeler kan disse farmasøytiske preparater inneholde egnede, farmasøytisk akseptable bærere omfattende eksipienter og hjelpestoffer som letter prosessering av de aktive forbindelser til preparater som kan benyttes farmasøytisk. Preparater
 15 formulert for oral administrering kan foreligge i form av tabletter, dragéer, kapsler eller oppløsninger. De farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan fremstilles på i og for seg kjent måte, for eksempel ved hjelp av konvensjonell blanding, oppløsning, granulering, dragéefremstilling, levitatering, emulgering, innkapsling, innfangning eller lyofilisering.

Formuleringer egnet for topisk administrering inkluderer flytende eller halvflytende preparater egnet for penetrering gjennom huden på det sete der behandling ønskes eller kreves, for eksempel linimenter, lotioner, kremer, salver eller pastaer, og dråper egnet for administrering til øyet, øret eller nesen. Dråper ifølge oppfinnelsen kan omfatte sterile, vandige eller oljeholdige oppløsninger eller suspensjoner og kan fremstilles ved oppløsning av den aktive bestanddel i en egnet, vandig oppløsning av et baktericid og/eller fungicidmiddel og/eller et hvilket som helst annet conserveringsmiddel, og inkluderer fortrinnsvis et overflateaktivt middel. Den resulterende oppløsning kan så gjøres klar og steriliseres ved filtrering og overføres til beholderen ved en aseptisk teknikk. Eksempler på baktericide og fungicide midler som er egnet for innarbeiding i dråpene er fenykvikksølvnitrat eller -acetat (0,002 %) (benzalkoniumklorid) (0,01 %) og klorheksidinacetat (0,01 %). Egnede oppløsningsmidler for fremstilling av en oljeoppløsning inkluderer glyserol, fortynnet alkohol og propylenglykol.
 25
 30

Lotioner ifølge oppfinnelsen inkluderer de som er egnet for applikering på hud eller øye. Enhver øyelotion kan omfatte en steril, vandig oppløsning som eventuelt inneholder et

baktericid og kan fremstilles ved metoder tilsvarende de som benyttes for fremstilling av dråper. Lotioner eller linimenter for applikering på huden kan også inkludere et middel for å fremskynde tørkning og for å avkjøle huden, for eksempel en alkohol eller acetone, og /eller en fukter som glyserol, eller en olje som ricinusolje eller arakisolje.

- 5 Kremer, salver og pastaer ifølge oppfinnelsen er halvaste formuleringer av den aktive bestanddel for ekstern applikering. Disse kan fremstilles ved å blande den aktive bestanddel i finoppdelt eller pulverform, alene eller i oppløsning eller suspensjon i et vandig eller ikke-vandig fluid, ved hjelp av et egnet maskineri, med en fett- eller ikke-fettbasis. Basisen kan omfatte hydrokarboner som hard, myk eller flytende parafin, glyserol, bivoks, 10 en metallsåpe; en mucilage; en olje av naturlig opprinnelse som mandel-, mais-, arakis-, ricinus- eller olivenolje; ullfett eller derivater derav, eller en fettsyre som stearin- eller oljesyre sammen med en alkohol som propylenglykol eller makrogeler. Formuleringen kan inkorporere et hvilket som helst egnet, overflateaktivt middel som et anionisk, kationisk eller ikke-ionisk overflateaktivt middel som sorbitanestere eller polyoksyetylenderivater 15 derav. Suspensjonsmidler som naturlige gummier, cellulosederivater eller uorganiske materialer som silisiumholdige materialer, og andre bestanddeler som lanolin, kan også innarbeides.

- Farmasøytiske formuleringer for parenteral administrering inkluderer vandige oppløsninger av de aktive forbindelser i vannoppløselig form. Videre kan suspensjonene av aktive 20 forbindelser fremstilles som egnede oljeinjeksjonssuspensjoner. Egnede lipofile oppløsningsmidler eller vehikler inkluderer fettoljer som sesamolje eller syntetiske fettsyreestere som etyloleat eller triglycerider, eller liposomer. Vandige injeksjonssuspensjoner kan inneholde substanser som øker suspensjonens viskositet som natriumkarboksymetylcellulose, sorbitol eller dekstran. Eventuelt kan suspensjonen også inneholde egnede stabilisatorer eller midler som øker oppløseligheten for forbindelsene for å tillate fremstilling av 25 meget konsentrerte oppløsninger.

- Farmasøytiske preparater for oral anvendelse kan oppnås ved å kombinere de aktive forbindelser med fast eksipient, eventuelt oppmaling av den resulterende blanding og prosessering av blandingen av granuler, etter tilsetning av egnede hjelpestoffer hvis dette er 30 ønskelig, for å oppnås tabletter eller dragéekjerner. Egnede eksipienter er særlig fyllstoffer som sukke, inkludert laktose, sukrose, mannitol eller sorbitol; cellulosepreparater som for eksempel mais-, hvete-, ris- eller potetstivelse, gelatin, tragantgummi, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, natriumkarboksymetylcellulose og/eller polyvinylpyrrolidon

(PVP). Hvis ønskelig kan disintegreringsmidler tilsettes som fernettet polyvinylpyrrolidon, agar eller alginsyre eller et salt derav om natriumalginat.

Dragéekjerner tilveiebringes med egnet belegg. For dette formål kan det benyttes konsentrerte sukkeroppløsninger som eventuelt kan inneholde gummi arabicum, talkum, polyvinylpyrrolidon, karbopolgel, polyetylenglykol og/eller titandioksid, lakkoppløsninger og egnede organiske oppløsningsmidler eller oppløsningsmiddelblandinger. Fargestoffer eller pigmenter kan settes til tablettene eller dragéebeleggene for identifisering eller for å karakterisere forskjellige kombinasjoner av aktive forbindelsesdoser.

Farmasøytiske preparater som kan benyttes oralt, inkluderer såkalt push-fit-kapsler fremstilt av gelatin, så vel som myke, forseglede kapsler fremstilt av gelatin og en mykner som glyserol eller sorbitol. Push-fit-kapslene kan inneholde de aktive bestanddeler blandet med fyllstoff som laktose, bindemidler som stivelser og/eller lubrikanter som talkum eller magnesiumstearat og, eventuelt, stabilisatorer. I myke kapsler kan de aktive forbindelser oppløses eller suspenderes i egnede væsker som fettoljer, flytende parafin eller flytende polyetylenglykoler. I tillegg kan det tilsettes stabilisatorer.

Preparater kan inneholde et buffersystem hvis dette er ønskelig. Buffersystemer velges for å holde eller bufre pH-verdien i preparatet innen et ønsket område. Uttrykket "buffer-system" eller "buffer" slik uttrykkene benyttes her, henviser til et oppløst middel eller flere slike, som, når de foreligger i vannoppløsning, stabiliserer en slik oppløsning mot vesentlige forandringer i pH-verdien (eller hydrogenionkonsentrasjonen eller -aktiviteten) når syrer eller baser tilsettes. Slike oppløste midler som således er ansvarlige for en motstand mot eller forandring i pH-verdier fra en utgangsbuffret pH-verdi i området som indikert ovenfor, er velkjente. Mens det finnes tallrike, egnede buffere er kaliumfosfatmonohydrat en foretrukket buffer.

Den endelige pH-verdien for det farmasøytiske preparat kan variere innen vide grenser innen det fysiologisk kompatible området. Nødvendigvis er den endelige pH-verdien en som ikke er irriterende for human hud og fortrinnsvis slik at den transdermale transport av den aktive forbindelsen, det vil si KoQ10, lettes. Uten å skade denne begrensning kan pH-verdien velges for å forbedre KoQ10-forbindelsens stabilitet og for å justere konsistensen hvis dette er nødvendig. I en utførelsesform er den foretrukne pH-verdi rundt 2,0 til rundt 7,4, mer spesielt rundt 3,0 til rundt 6,5 og helst fra rundt 3,5 til rundt 6,0.

For foretrukne vehikler for topisk avlevering er den gjenværende komponent i preparatet vann som nødvendigvis er renset, for eksempel deionisert vann. Slike avleveringsvehik-

kelpreparater inneholder vann i området mer enn rundt 50 opp til rundt 95 %, beregnet på den totale vekten av preparatet. Den spesifikke mengde av vann som er til stede er ikke kritisk men er imidlertid justerbar for å oppnå den ønskede viskositet (vanligvis rundt 50 cP (centipoise) til rundt 10 000 cP) og/eller konsentrasjonen av de andre komponenter.

5 Den topiske avleveringsvehikkel har fortrinnsvis en viskositet minst rundt 30 cP.

Andre kjente, transdermale hudpenetreringsenhancere kan også benyttes for å lette av-
 levering av KoQ10. Illustrerende er sulfoksider som dimetylsulfoksid (DMSO) og liknende;
 cykliske amider som 1-dodecylazacyklopentan-2-on (Azone™, et registrert varemerke hos
 Nelson Research, Inc.) og liknende; amider som N,N-dimetylacetamid (DMA), N,N-
 10 dietyltoluamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetyloktamid, N,N-dimetylacetamid og lik-
 nende; pyrrolidonderivater som N-metyl-2-pyrrolidon, 2-pyrrolidon, 2-pyrrolidon-5-
 karboksylsyre, N-(2-hydroksyetyl)-2-pyrrolidon eller fettsyreestere derav, 1-lauryl-4-
 metoksykarbonyl-2-pyrrolidon, N-talgalkylpyrrolidoner og liknende; polyoler som propylen-
 glykol, etylenglykol, polyetylenglykol, dipropylenglykol, glyserol, heksantriol og liknende;
 15 rette eller forgrenede fettsyrer som olje-, linol-, laurin-, valerian-, heptan-, kapron-, my-
 ristin-, isovalerian-, neopentan-, trimetylheksan- eller isostearinsyre og liknende; alkoholer
 som etanol, propanol, butanol, oktanol, oleylstearat, linoleyl og liknende; anioniske surfak-
 tanter som natriumlaurat, natriumlaurylsulfat og liknende; kationiske surfaktanter som
 benzalkoniumklorid, dodecyltrimetylammoniumklorid, cetyltrimetylammoniumbromid og
 20 liknende; ikke-ioniske surfaktanter som de propoksylerede polyoksyetylenetere, for eksem-
 pel Poloxamer 231, Poloxamer 182, Poloxamer 184 og liknende; de etoksylerede fettsyrer,
 for eksempel Tween 20, Myrj 45 og liknende, sorbitanderivatene, for eksempel Tween 40,
 Tween 60, Tween 80, Span 60 og liknende, de etoksylerede alkoholer som polyoksyety-
 len(4)lauryleter (Brij 30), polyoksyetylen(2)oleyleter (Brij 93) og liknende, lecitin og lecitin-
 25 derivater og liknende; terpener som D-limonen, α -pinen, β -karen, α -terpinol, karvol,
 karvon, menton, limonenoksid, α -pinenoksid, eukalyptusolje og liknende.

Også egnet som hudpenetreringsforsterkere er organiske syrer og estere som salicylsy-
 rer, metylsalicylat, sitron- eller ravsyre og liknende.

Angiogenese og angiogeneseavhengige sykdommer

30 Som benyttet her inkluderer uttrykkene "angiogeneseinhibitorisk", "angiogeneseinhiberen-
 de" eller "antiangiogenisk" vaskulogenese og er ment å bety å bevirke en reduksjon i
 grad, mengde eller hastighet for neovaskularisering. Bevirkning av en reduksjon i grad,
 mengde og hastighet for endotelial celleprolifisering eller -migrering i vevet er et spesifikt
 eksempel på inhibering av angiogenese.

Uttrykket "angiogeneseinhibitorisk preparat" henviser til et preparat omfattende KoQ10 som inhiberer tumormedierte angiogeneseprosesser som endotelialcellemigrering, proliferering, rørdannelse, og som deretter fører til inhibering av genereringen av nye blodkar fra de eksisterende, og som en konsekvens inhibering av angiogeneseavhengige sykdommer, for eksempel angiogenese mediert av tumorer, se for eksempel figurene 29A og 29B der et preparat omfattende KoQ10 inhiberer tumormediert angiogenese i et vev sammenliknet med kontrollvev i fravær av enhver KoQ10. Preparatet omfattende KoQ10 er beskrevet i detalj i eksemplene nedenfor.

Som benyttet her er uttrykket "angiogeneseavhengig sykdom" ment å bety en sykdom der prosessen med angiogenese eller vaskulogenese vedlikeholder eller øker en patologisk tilstand. Særlig henviser angiogeneseavhengig sykdom til tumormediert angiogenese.

Angiogenese er dannelsen av nye blodkar fra tidligere eksisterende kapillarer eller postkapillare venuler. Vaskulogeneser er resultatet fra dannelsen av nye blodkar som oppstår fra angioblaster som er endoteliale celleforløpere. Begge prosesser resulterer i dannelsen av nye blodkar og er inkludert innen betydningen av uttrykket angiogeneseavhengige sykdommer. Tilsvarende er uttrykket "angiogenese" som benyttet her, ment å inkludere *de novo*-dannelse av kar som de som oppstår fra vaskulogenese så vel som de som oppstår fra forgrening og knoppskyting av eksisterende kar, kapillarer og venuler.

Angiogenese, inkludert vaskulogenese, er en viktig fysiologisk prosess uten hvilken embryonisk utvikling og sårheling ikke ville inntre. Imidlertid blir angiogenese også upassende rekruttert til tallrike, patologiske tilstander som et middel for å tilveiebringe adekvat blod- og næringstilførsel til cellene i det påvirkede vev. Mange av disse patologiske tilstander involverer feilaktig celleprolifisering eller –regulering. Slike tilstander der angiogenese antas å være viktig angis her som angiogenese-avhengige sykdommer. Imidlertid kan metodene ifølge oppfinnelsen også benyttes fordelaktig for å inhibere angiogenese assosiert med normale, fysiologiske prosesser. For eksempel kan inhibering av angiogenese, assosiert med menstruasjonssyklusen, benyttes profylaktisk som et effektivt middel for fødselskontroll. Derfor er beskrivelsen nedenfor i forbindelse med behandling av angiogeneseavhengige sykdommer også anvendelig for inhibering av normale, angiogeniske responser der et profylaktisk eller terapeutisk behov eller en fordel foreligger.

Angiogeneseavhengige sykdommer inkluderer for eksempel inflammatoriske forstyrrelser som immun- og ikke-immuninflammasjon, rheumatoid artritt, kronisk artikulær reumatisme og psoriasis; forstyrrelser assosiert med gal eller uønsket invasjon av kar som diabetisk

retinopati, neovaskulært glaukom, prematuritetsretinopati, makulær degenerering, korneal podingsreaksjon, retrolental fibroplasi, rubeose, kapillær proliferering i aterosklerotisk plakk og osteoporose; og cancerassosierte forstyrrelser, inkludert for eksempel faste tumorer, tumormetastaser, blodfødte tumorer så som leukemier, angiofibromer, Kaposi-sarkom, 5 benigne tumorer som hemangiomer, akustiske neuromer, neurofibromer, trakomer og pyogeniske granulomer, så vel som andre cancere som krever neovaskularisering for å understøtte tumorvekst. Ytterligere eksempler på angiogeneseavhengige sykdommer inkluderer for eksempel Osler-Webber-syndromet; myokardial angiogenese; plakk-neovaskularisering; telangiektasi; hemofiliske ledd og sårgranulering. Andre sykdommer 10 der angiogenese spiller en rolle ved opprettholdelse eller progresjon av den patologiske tilstand er velkjente for fagfolk på området og er likeledes ment å være inkludert innen betydningen av uttrykket slik det her benyttes. Fortrinnsvis henviser angiogenesemedierte sykdommer til tumorindusert angiogenese.

In vitro biologisk analyse av angiogeneseinhiberende aktivitet

KoQ10 forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan testes med henblikk på deres angiogeneseinhiberende aktivitet i flere analysesystemer *in vitro* og disse ligger vel innenfor fagmannens kunnskapsområde. Endotelialceller, for eksempel human umbilikal veneendotelialceller (HUVEC) eller human mikrovaskulære endotelialceller (HMVEC) prepareres eller oppnås kommersielt og blandes i en konsentrasjon på 2×10^5 celler/ml med fibrinogen (5 mg/ml i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) i et vektforhold på 1:1. Trombin tilsettes i 15 en mengde av 5 enheter/ml sluttkonsentrasjon og blandingen overføres umiddelbart til en 24-brønners plate med 0,5 ml per brønn. Fibrinogen tillates å danne seg og deretter blir vaskulær endotelialvekstfaktor (VEGF) og fibroblastvekstfaktor basisk (FGF2) satt til brønnene (til 5 ng/ml sluttkonsentrasjon) sammen med testforbindelsen, som beskrevet i 20 eksemplene nedenfor. Cellene inkuberes ved 37°C i 5 % CO₂ i 4 dager, ved hvilket tidsrom cellene i hver brønn telles og klassifiseres som enten avrundede, langstrakte uten forgreninger, langstrakte med en forgrening eller langstrakte med 2 eller flere forgreninger. Resultatene uttrykkes som gjennomsnittet av 5 forskjellige brønner for hver konsentrasjon av forbindelsen. Typisk forblir, i nærvær av angiogeniske inhibitorer, cellene enten 25 avrundet eller danner ikke-differensierte rør (for eksempel 0 eller 1 forgrening). Denne analyse erkjennes i teknikken som prediktiv på angiogenisk effektivitet (eller angiogeneseinhiberende aktivitet *in vivo* (Grant *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A:327-336 (1991); Min *et al.*, *Cancer Res.* 56:2428-2433 (1996)). 30

I en alternativ analyse blir endotelialcellerørdannelse observert når endotelialceller dyrkes på MatrigelTM-matriks-belagte plater, kommersielt tilgjengelige fra Becton Dickinson of Bedford, Pa. (Schnaper *et al.*, *J. Cell. Physiol.* 165:107-118 (1995)). Endotelialceller (1×10^4 celler/brønn) overføres til MatrigelTM-matriks-belagte 24-brønners plater, og rørdannelsen kvantiteres etter 48 timer. Inhibitorer testes ved tilsetning enten samtidig som endotelialceller eller ved forskjellige tidspunkter deretter.

Denne analyse modellerer angiogenese ved til endotelialcellene å presentere en spesiell type basismembran, nemlig sjiktet av matriks med migrerende og differensierende endotelialceller slik det kan forventes ved et først møte. I tillegg til bundne vekstfaktorer kan matrikskomponentene som finnes i MatrigelTM-matriksen (og i basismembraner *in situ*) eller proteolytiske produkter derav, også være stimulatoriske for endotelialcellerørdannelse som gjør denne modell komplementær til fibringelangiogenesemodellen.

I tillegg kan angiogeniske aktiviteter for forbindelsene ifølge oppfinnelsen evalueres ved kylling korioallantoisk membran-(CAM-)analyse (Oikawa *et al.*, *Cancer Lett.* 59:57-66 (1991)).

Kombinasjonsterapier

KoQ10-terapeutiske preparater ifølge oppfinnelsen kan kombineres med enhver annen metode som generelt benyttes ved behandling av en spesiell tumor, sykdom eller forstyrrelse som pasienten viser. Så lenge en spesiell terapeutisk vei ikke er kjent for å være skadelig for pasientens tilstand per se og ikke signifikant motvirker KoQ10 preparatbehandling, er kombinasjonen med oppfinnelsen omfattet.

I forbindelse med behandling av fast tumor kan foreliggende oppfinnelse benyttes i kombinasjon med klassiske veier som kirurgi, radioterapi, kjemoterapi og liknende. Oppfinnelsen tilveiebringer derfor kombinerte terapier hvori KoQ10-terapeutiske preparater benyttes samtidig med, før eller etter kirurgi eller strålingsbehandling; eller administreres til pasienter med, før eller etter konvensjonelle kjemoterapeutiske, radioterapeutiske eller andre antiangiogeniske midler, eller innsiktede immunotoksiner eller koagulgander.

Kombinasjonsterapi for andre, vaskulære sykdommer er også omfattet. Et spesielt eksempel på en slik er benign prostatisk hyperplasi (BPH) som kan behandles med KoQ10-preparater i kombinasjon med andre behandlinger som i dag benyttes i teknikken, for eksempel innsikting av immunotoksiner mot markører lokalisert innen BPH, slik som PSA.

Nå ett eller flere midler benyttes i kombinasjon med KoQ10-preparatene er det intet krav for de kombinerte resultater at de skal være additive når det gjelder effektene som observeres når hver behandling gjennomføres separat. Selv om minst additive effekter generelt er ønskelig vil enhver økt antitumoreffekt over en av enkeltterapiene være av fordel. Heller
 5 ikke er det noe spesielt krav om at den kombinerte behandling skal vise synergistiske effekter selv om dette selvfølgelig er både mulig og fordelaktig.

For å gjennomføres kombinert antitumorterapi vil man ganske enkelt administrere til et dyr et KoQ10-preparatsammenstilling i kombinasjon med et annet anti-cancermiddel på en måte som er effektiv for å resultere i de kombinerte, antitumorvirkninger hos dyret. Midle-
 10 ne tilveiebringes derfor i effektive mengder og i tidsom som er effektive for å resultere i de kombinerte nærvær i tumorvaskulaturen og deres kombinerte virkninger i tumoromgivelsene. For å oppnå dette mål kan KoQ10-preparatene og andre anti-cancermidler administreres til dyret samtidig, enten i et enkelt preparat eller som to distinkte preparater ved bruk av forskjellige administreringsveier.

Alternativt kan KoQ10-preparatmediert behandling komme foran eller følge behandling med et andre anticancermiddel i for eksempel intervaller fra min til uker. I visse utførelsesformer der anticancermidlet og KoQ10-preparatet applikeres separat til dyret vil man sikre at en signifikant tidsperiode ikke utløper mellom tidspunktet for hver avlevering slik at anticancermidlet og KoQ10-preparatet fremdeles vil være i stand til å utøve en fordelaktig,
 15 kombinert effekt i tumoren. I slike tilfeller er det tatt sikte på at man vil bringe tumoren i kontakt med begge midler innen rundt 5 min til rundt 1 uke fra hverandre og mer spesielt innen rundt 12-72 timer fra hverandre med en forsinkelsestid på kun rundt 12-48 timer som mest foretrukket.

Den generelle bruk av kombinasjoner av substanser ved cancerbehandling er velkjent.

For eksempel beskriver US 5 710 134 (ansett som del av beskrivelsen) komponenter som induserer nekrose i tumorer i kombinasjon med ikke-toksiske substanser eller "prodrugs". Enzymene som settes fri ved nekrotiske prosesser spalter det ikke-toksiske "prodrug" til det toksiske "medikament", noe som fører til tumorcelledød. Også US 5 747 469 (ansett som del av beskrivelsen) beskriver kombinert bruk av virale vektorer som koder p53-og
 25 DNA-skadende midler. Enhver slik tilsvarende vei kan benyttes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse.

I noen situasjoner kan det også være ønskelig å forlenge tidsperioden for behandlingen signifikant der det går flere dager (2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8), flere uker (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller

8) eller sågar flere måneder (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8) mellom de respektive administreringer. Dette vil være fordelaktig under omstendigheter der en behandling var ment for i det vesentlige å destruere tumoren, som KoQ10-preparatbehandlingen, og den andre behandling var ment å forhindre mikrometastaser eller tumorgjenvækst som administrering av et antiangiogenisk middel.

Det er også tatt sikte på at en administrering av enten KoQ10-preparatet eller et annet anticancermiddel vil benyttes. KoQ10-preparatet og anticancermidler kan administreres om hverandre, på alternerende dager eller uker; eller en sekvens av KoQ10-preparatbehandlingen kan gis, fulgt av en sekvens av anticancermiddelterapi. For å oppnå tumorregresjon ved bruk av kombinert terapi er i et hvert tilfelle alt som er nødvendig, å avlevere begge midler i en kombinert mengde som er effektiv til å utøve en antitumoreffekt, uansett tidspunktene for administrering.

Uttrykt ved kirurgi kan en hvilken som helst kirurgisk intervensjon gjennomføres i kombinasjon med oppfinnelsen. I forbindelse med radioterapi er det forutsatt en hvilken som helst mekanisme for indusering av DNA-skade lokalt i tumorceller, så som γ -stråling, røntgen, UV-stråling, mikrobølger og sågar elektroniske emisjoner og liknende. Den styrte avlevering av radioisotoper i tumorceller er også omfattet, og dette kan benyttes i forbindelse med et innsiktet antistoff eller andre innsiktingsmidler.

Cytokinterapi har også vist seg å være en effektiv partner for kombinerte, terapeutiske regimer. Forskjellige cytokiner kan benyttes i slike kombinerte veier. Eksempler på cytokiner inkluderer IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF α , TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ . Cytokiner administreres ifølge standardregimer, konsistent med kliniske indikasjoner som tilstanden hos pasienten og cytokinets relative toksisitet. Uteroglobiner kan også benyttes for prevensjon eller inhibering av metastaser (US 5 696 092; ansett som del av beskrivelsen).

KoQ10 preparater og kombinasjonskjemoterapeutika

I visse utførelsesformer kan KoQ10-preparater ifølge oppfinnelsen administreres i kombinasjon med et annet kjemoterapeutisk middel. Uansett den eller de underliggende mekanismer kan et antall kjemoterapeutiske midler benyttes i de kombinerte behandlingsmetoder som beskrives her. Terapeutiske midler kan for eksempel inkludere kjemoterapeutiske midler som cyklofosfamid (CTX, 25 mg/kg/dag, *p.o.*), taksaner (paklitaksel eller docetaksel), busulfan, cisplatin, metotreksat, daunorubicin, doksorubicin, melfalan, kladri-

bin, vinkristin, vinblastin, klorambucil, tamoksifen, taksol, etoposid (VP-16), adriamycin, 5-fluoruracil (5FU), kamptotecin, aktinomycin-D, mitomycin C, cisplatin (CDDP), kombretas-tatin(er) og derivater og prodrugs derav.

Slik fagmannen på området vil forstå vil de riktige doser av kjemoterapeutiske midler ge-
 5 nerelt ligge rundt de som allerede benyttes i kliniske terapier der kjemoterapeutika admi-
 nistreres alene eller i kombinasjon med andre kjemoterapeutika. Som eksempel kan mid-
 ler som cisplatin og andre DNA alkyleringsmidler, benyttes. Cisplatin har vært benyttet i
 utstrakt grad for å behandle cancer med effektive doser benyttet i kliniske anvendelser på
 20 mg/m² i 5 dager hver tredje uke for til sammen tre runder. Cisplatin blir ikke absorbert
 10 oralt og må derfor avgis via injeksjon intravenøst, subkuttant, intratumoralt eller intraperito-
 nealt.

Ytterligere brukbare midler inkluderer forbindelser som interferer med DNA-replikking,
 mitose og kromosomal segregering. Slike kjemoterapeutiske midler inkluderer adriamycin,
 også kjent som doksorubicin, etoposid, verapamil, podofyllotoksin og liknende. Utstrakt
 15 benyttet i et klinisk oppsett for behandling av neoplasmer blir disse forbindelser admini-
 strert via bolusinjeksjoner intravenøst i doser fra rundt 25-75 mg/m² i 21 dagers intervaller
 for adriamycin til 35-50 mg/m² for etoposid intravenøst eller den doble intravenøse dose
 oralt.

Midler som avbryter syntesen og fideliteten for polynukleotidforløpere, kan også benyttes.
 20 Spesielt brukbare er midler som har undergått utstrakt testing og er lett tilgjengelig. Som
 slike blir midler som 5-fluoruracil (5-FU) fortrinnsvis benyttet ved neoplastisk vev, noe som
 gjør dette middel spesielt brukbart for innsikting mot neoplastiske celler. På tross av heller
 høy toksisitet er 5-FU applikerbar innen et vidt område av bærere inkludert topiske, imid-
 lertid blir intravenøs administrering med doser i området 3 til 15 mg/kg/dag vanligvis be-
 25 nyttet.

Fagmannen finner retningslinjer i "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15. utg., kapittel
 33, særlig s. 624-652, for ikke-begrensede eksempler på andre kjemoterapeutiske midler
 som kan benyttes i kombinasjonsterapier med KoQ10-preparater. En viss variasjon i do-
 seringen vil nødvendigvis inntre avhengig av tilstanden hos individet som behandles. Den
 30 ansvarlige lege vil være i stand til å bestemme den egnede dose for det individuelle indi-
 vid.

Antiangiogenetika

Uttrykket "angiogenese" henviser til generering av nye blodkar, generelt i et vev eller et organ. Under normale, fysiologiske betingelser undergår mennesker eller dyr angiogenese kun i meget spesifikt begrensede situasjoner. For eksempel blir angiogenese vanligvis observert ved sårheling, føtal og embryonisk utvikling og dannelse av corpus luteum, endometrium og placenta. Ukontrollert (persistent og/eller ikke-regulert) angiogenese er relatert til forskjellige sykdomstilstander og inntreffer under tumorvekst og metastase.

Både kontrollert og ukontrollert angiogenese antas å forløpe på lik måte. Endotelialceller og pericytter, omgitt av en basismembran, danner kapillære blodkar. Angiogenese begynner med erosjon av basismembran på grunn av enzymer som frigis av endotelialceller og leukocytter. Endotelialcellene som fører linjen av blodkar, trenger så gjennom basismembranen. Angiogeniske stimulanter induserer endotelialcellene til å migrere gjennom den eroderte basismembran. De migrerende celler danner et "skudd" fra opphavsblodkar der endotelialcellene undergår mitose og prolifererer. Endotelialskuddene smelter sammen med hverandre og danner kapillære løkker og danner nye blodkar.

Da persistent, ikke-regulert angiogenese inntreffer under tumorutvikling og metastase, kan behandlingsmetodene ifølge oppfinnelsen benyttes i kombinasjon med hvilke som helst en eller flere "antiangiogeniske" terapier. Eksempler på antiangiogeniske midler som er nyttige i forbindelse med kombinert terapi er oppsummert i tabell 1. Hvert av midlene som er oppsummert der, er et eksempel og ikke på noen måte ment å være begrensende.

TABELL 1 Inhibitorer og negative regulatorer av angiogenese

Substanser

Angiostatin
Endostatin
16 kDa prolaktin fragment
Lamininpeptider
Fibronectinpeptider
Vevmetalloproteinaseinhibitorer (TIMP 1, 2, 3, 4)
Plasminogenaktivatorinhibitorer (PAI-1, -2)
Tumornekrosefaktor α
(høy dose, *in vitro*)
TGF- β 1
Interferoner (IFN- α , - β , γ)

ELR- CXC kjemokiner: IL-12; SDF-1; MIG; platefaktor 4 (PF-4);
 IP-10
 Trombospondin (TSP)
 SPARC
 2-metoksyestradiol
 2-proliferin-relatert protein
 Suramin
 Talidomid
 Kortison
 Fumagillin (AGM-1470; TNP-470)
 Tamoksifen
 Koreansk mistleekstrakt (*Viscum album coloratum*)
 Retionoider
 CM101
 Deksametason
 Leukemiinhibitorisk faktor (LIF)

En viss foretrukket forbindelse for bruk i inhiberende angiogenese er et protein kalt "angiostatin". Denne komponent er beskrevet i US 5 776 704; 5 639 725 og 5 733 876, alle ansett som del av beskrivelsen. Angiostatin er et protein med en molekylvekt på mellom rundt 38 kD og rundt 45 kD, bestemt ved reduserende polyakrylamidgelelektroforese, som inneholder omtrent Kringleområdene 1 til og med 4 av et plasminogenmolekyl. Angiostatin har generelt en aminosyresekvens i det vesentlige tilsvarende den til et fragment av murinplasminogen som begynner ved aminosyre nummer 98 av et intakt murin plasminogenmolekyl.

Aminosyresekvensen for angiostatin varierer lett mellom arter. I human angiostatin er aminosyresekvensen i det vesentlige lik sekvensen til det ovenfor beskrevne murine plasminogenfragment, selv om en aktiv human angiostatinsekvens kan starte ved enten aminosyre nummer 97 eller 99 av en intakt human plasminogenaminosyresekvens. Videre kan humanplasminogen benyttes da det har tilsvarende antiangiogenisk aktivitet som vist i en musetumormodell.

Visse antiangiogeniske terapier er allerede påvist å forårsake tumorregresjoner og angiostatin er et slikt middel. Endostatin, et 20 kDa COOH-terminalfragment av kollagen XVIII, det bakterielle polysakkarid CM101 og antistoffet LM609 har også angiostatisk akti-

vitet. I lys av deres andre egenskaper angis disse imidlertid som anti-vaskulære terapier eller tumorkartoksiner da de ikke bare inhiberer angiogenese, men også initierer destruering av tumorceller via for det meste ikke definerte mekanismer. Deres kombinasjon med oppfinnelsen er klart omfattet av oppfinnelsen.

5 Angiostatin og endostatin er blitt fokus for intense studier da de er de første angiogeneseinhibitorer som har demonstrert evnen til ikke bare å inhibere tumorvekst, men også forårsake tumorregresjon i mus. Det er flere proteaser som er påvist å produsere angiostatin fra plasminogen, inkludert elastase, makrofag metalloelastase (MME), matrilysin (MMP-7) og 92 kDa gelatinase B/type IV kollagenase (MMP-9).

10 MME kan produsere angiostatin fra plasminogen i tumorer, og granulocytmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) oppregulerer ekspresjonen av MME ved makrofager som induserer produksjonen av angiostatin. MMEs rolle i angiostatingenerering understøttes av det funn at MME virkelig uttrykkes i kliniske prøver av hepatocellulære karsinomer fra pasienter. En annen protease som antas å være i stand til å produsere angiostatin, er stromelysin-1 (MMP-3). MMP-3 er påvist å produsere angiostatinliknende fragmenter fra plasminogen *in vitro*.

CM101 er et bakterielt polysakkarid som er godt karakterisert ved sin evne til å inducere neovaskulær inflammasjon i tumorer. CM101 binder til og fornetter reseptorer som uttrykkes på dedifferensiert endotel som stimulerer aktivering av komplementsystemet. Det initierer også en cytokindrevet, inflammatorisk respons som selektivt sikter på tumoren. Den er et antipatoangiogenisk middel som regulerer ekspresjonen av VEGF og dens reseptorer.

Trombospondin (TSP-1) og platefaktor 4 (PF4) kan også benyttes i kombinasjon med oppfinnelsen. Disse er begge angiogeneseinhibitorer som assosierer med heparin og finnes i plate α -granuler. TSP-1 er et større 450 kDa multidomene glykoprotein som er en bestanddel av den ekstracellulære matriks. TSP-1 binder til mange av proteoglykanmolekylene som finnes i den ekstracellulære matriks inkludert HSPG'er, fibronektin, laminin og forskjellige typer kollagen. TSP-1 inhiberer endotelilacellemigrering og -proliferering *in vitro* og angiogenese *in vivo*. TSP-1 kan også undertyke den malignante fenotype og tumorigenese av transformerte endotelialceller. Tumorsuppressorgenet p53 er påvist direkte å redusere ekspresjonen av TSP-1 slik at tap av p53-aktivitet forårsaker en drastisk reduksjon i TSP-1-produksjon og en samtidig økning i tumorinitiert angiogenese.

PF4 er et 70aa-protein som er medlem av CXC ELR-familien av kjemokiner som er i stand til potent å inhibere endotelialcelleprolifisering *in vitro* og angiogenese *in vivo*. PF4 administrert intratumoralt eller avgitt ved hjelp av en adenoviral vektor er i stand til å forårsake inhibering av tumorvekst.

5 Interferoner og metalloproteinaseinhibitorer er to andre klasser av naturlig opptredende angiogeniske inhibitorer som kan kombineres med oppfinnelsen. Den antiendoteliale aktivitet for interferonene har vært kjent siden de tidlige 1980-årene, imidlertid er inhiberingsmekanismen fremdeles uklar. Det er kjent at de kan inhibere endotelialcellemigrering og at de har en viss antiangiogenisk aktivitet *in vivo* som muligens medieres av en evne til å
10 inhibere produksjonen av angiogeniske promotere i tumorceller. Spesielt vaskulære tumorer er sensitive mot interferon, for eksempel kan prolifererende hemangiomer behandles med IFN α .

Vevinhibitorer av metalloproteinaser (TIMP'er) er en familie av naturlig forekommende inhibitorer av matriksmetalloproteaser (MMP'er) som også kan inhibere angiogenese og
15 som kan benyttes i kombinerte behandlingsprotokoller med foreliggende oppfinnelse. MMP'er spiller en nøkkelrolle i den angiogeniske prosess da de bryter ned matriksen gjennom hvilken endotelialcellene og fibroblastene migrerer når de utvider eller remodelerer det vaskulære nettverk. Således er et medlem av MMP'ene, MMP-2, påvist å assosiere med aktivert endotel via integrin $\alpha v \beta 3$, antagelig for dette formål. Hvis denne interak-
20 sjon avbrytes av et fragment av MMP-2, blir angiogenesen nedregulert og tumorvekst inhibert.

Det finnes et antall farmakologiske midler som inhiberer angiogenese, et hvilket som helst ett eller flere av disse kan benyttes i kombinasjon med foreliggende oppfinnelse. Disse inkluderer AGM-1470/TNP-470, thalidomid og karboksyamidotriazol (CAI). Fumagilin ble
25 funnet å være en potent inhibitor av angiogenese i 1990 og etter dette er de syntetiske analoger av fumagilin, AGM-1470 og TNP-470 utviklet. Begge disse medikamenter inhiberer endotelialprolifisering *in vitro* og angiogenese *in vivo*. TNP-470 er studert grundig i human kliniske prøver med data som antyder at langtidsadministrering er optimal.

Thalidomid ble opprinnelig benyttet som et sedativ, men ble funnet å være et potent tera-
30 togen og ble avbrutt. I 1994 ble det funnet at thalidomid er en angiogeneseinhibitor. Thalidomid er i dag i kliniske prøver som anticancermiddel så vel som behandling av vaskulære øyesykdommer.

CAI er en syntetisk inhibitor av angiogenese med liten molekylvekt og som virker som en kalsiumkanalblokker som forhindrer aktinreorganisering, endotelialcellemigrering og utspredning på kollagen IV. CAI inhiberer neovaskularisering i fysiologisk oppnåelige konsentrasjoner og tolereres godt oralt av cancerpasienter. Kliniske prøver med CAI har gitt

Kortison i nærvær av heparin eller heparinfragmenter er også påvist å inhibere tumorvekst i mus ved å blokkere endotelialcelleprolifisering. Mekanismen som er involvert i den additive, inhibitoriske effekt av steroidet og heparin, er uklar selv om det antas at heparin kan øke opptaket av steroidet hos endotelialceller. Blandingen er påvist å øke oppløsningen av basismembran under nydannede kapillarer, og dette er også en mulig forklaring på den additive, angiostatisk effekt. Heparin-kortisol-konjugater har også potente angiostatisk og antitumoreffekter *in vivo*.

Ytterligere, spesifikke angiogeneseinhibitorer inkluderer, men er ikke begrenset til, anti-invasiv faktor, retinonsyre og paklitaksel (US 5 716 981); ansett som del av beskrivelsen); AGM-1470 (Ingber et al., Nature, 48:555-557 1990: ansett som del av beskrivelsen); høybruskekstrakt (US 5 618 925; ansett som del av beskrivelsen); anionisk polyamid eller polyureaoligomerer (US 5 593 664): ansett som del av beskrivelsen); oksindolderivater (US 5 576 330; ansett som del av beskrivelsen); østradiolderivater (US 5 504 074; ansett som del av beskrivelsen); og tiazolopyrimidinderivater (US 5 599 813; ansett som del av beskrivelsen); er også omfattet for bruk som antiangiogeniske preparater for kombinert bruk med foreliggende oppfinnelse.

Preparater omfattende en antagonist av en $\alpha_v\beta_3$ -integrin, kan også benyttes for å inhibere angiogenese i kombinasjon med oppfinnelsen. Som beskrevet i US 5 776 591 (ansett som del av beskrivelsen), er RGD-holdige polypeptider og salter derav, inkludert cykliske polypeptider, egnede eksempler på $\alpha_v\beta_3$ -integrinantagonister.

Antistoffet LM609 mot $\alpha_v\beta_3$ -integrin induserer også tumorregresjoner. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -antagonister som LM609, induserer apoptose av angiogeniske endotelialceller som etterlater hvilende blodkar upåvirket. LM609 eller andre $\alpha_v\beta_3$ -antagonister kan også virke ved å inhibere interaksjonen mellom $\alpha_v\beta_3$ og MMP-2, et proteolytisk enzym som antas å spille en viktig rolle i migreringen av endotelialceller og fibroblaster.

Apoptose i det angiogeniske endotelium i dette tilfellet kan ha en kaskadeeffekt på resten av det vaskulære nettverket. Inhibering av det tumorvaskulære nettverket fra fullstendig respons på tumorens signal til å ekspandere kan således initiere den partielle eller full-

stendige kollaps av nettverket som resulterer i tumorcelledød og tap av tumorvolum. Det er mulig at endostatin og angiostatin virker på samme måte. Det faktum at LM609 ikke påvirker hvilende kar, men er i stand til å forårsake tumorregresjoner antyder sterkt at ikke alle blodkar i en tumor må siktes på for behandling for å oppnå en antitumoreffekt.

Ikke-innsiktede angiopoietiner som angiopoietin-2, kan også benyttes i kombinasjon med oppfinnelsen. De angiogeniske effekter av forskjellige regulatorer involverer en autokrin-løkke forbundet med angiopoietin-2. Bruken av angiopoietin-2, angiopoietin-1, angiopoietin-3 og angiopoietin-4 er således omfattet i forbindelse med oppfinnelsen. Andre metoder for terapeutisk intervensjon basert på endring av signal via Tie2-reseptoren kan også benyttes i kombinasjon hermed, som ved å benytte en oppløselig Tie2-reseptor i stand til å blokkere Tie2-aktivering (Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 95(15):8829-34, 1998). Avlevering av en slik sammenstilling ved bruk av rekombinant, adenoviral genterapi er påvist å være effektiv ved behandling av cancer og å redusere metastaser (Lin *et al.*, 1998).

KoQ10 preparater og kombinasjonsterapi med apoptoseinduserende midler

KoQ10-preparatbehandlingen kan også kombineres med behandlingsmetoder som inducerer apoptose i hvilke som helst celler i tumorer, inkludert tumorceller og tumorvaskulære, endoteliale celler. Selv om mange anticancermidler kan ha, som en del av deres virkningsmekanisme, en apoptoseinduserende effekt, er visse midler funnet, konstruert eller valgt med dette som en primær mekanisme, som beskrevet nedenfor.

Et antall onkogener er beskrevet å inhibere apoptose eller programmert celledød. Eksempler på onkogener i denne kategori inkluderer, men er ikke begrenset til *bcr-abl*, *bcl-2* (distinkt fra *bcl-1*, *cyklin D1*, genbank aksessnummer M14745, X06487; US 5 650 491; og 5 539 094; begge ansett som del av beskrivelsen) og familiemedlemmer som inkluderer *Bcl-xl*, *Mcl-1*, *Bak*, *A1*, *A20*. Overekspresjon av *bcl-2* ble først oppdaget i T-cellelymfomer. *bcl-2* virker som et onkogen ved binding og inaktivering av Bax, et protein i den apoptotiske vei. Inhibering av *bcl-2*-funksjonen forhindrer inaktivering av Bax og tillater at den apoptotiske vei kan fortsette. Således er inhibering av denne klasse onkogener, for eksempel ved bruk av antisensenukleotidsekvenser, omfattet for bruk ifølge oppfinnelsen i aspekter der forsterkning av apoptose er ønsket (US 5 650 491; 5 539 094; og 5 538 034; alle ansett som del av beskrivelsen).

Mange former for cancer har rapportert om mutasjoner i tumorsuppressorgener, for eksempel *p53*. Inaktivering av *p53* resulterer i en svikt til å fremme apoptose. Med denne

svikt fortsetter cancercellene i tumorigenese heller enn å bli destinert for celledød. Således er tilveiebringelse av tumorsuppressorer også omfattet for bruk ifølge oppfinnelsen for å stimulere celledød. Eksempler på tumorsuppressorer inkluderer, men er ikke begrenset til *p53*, retinoblastomgen (*Rb*), Wilms tumor (*WT1*), *bax* α , interleukin-1 β -konverterende enzym og familien, *MEN-1* gen, neurofibromatose, type 1 (*NF1*), cdk inhibitor p16, kolorektal cancergen (*DCC*), familial adenomatosepolyposegen (*FAP*), multipel tumorsuppressoren (*MTS-1*), *BRCA1* og *BRCA2*.

Foretrukket for anvendelse er *p53* (US 5 747 469; 5 677 178; og 5 756 455; begge ansett som del av beskrivelsen), retinoblastom, *BRCA1* (US 5 750 400; 5 654 155; 5 710 001; 5 756 294; 5 709 999; 5 693 473; 5 753 441; 5 622 829 og 5 747 282, alle ansett som del av beskrivelsen), *MEN1* (genbank aksessnummer U93236) og adenovirus *E1A*-gen (US 5 776 743; ansett som del av beskrivelsen).

Andre preparater som kan benyttes, inkluderer gener som koder den tumornekrosefaktorrelaterte apoptoseinduserende ligand, kalt TRAIL, og TRAIL-polypeptidet (US 5 763 223; ansett som del av beskrivelsen); den 24 kD apoptoseassosierte protease ifølge US 5 605 826 (ansett som del av beskrivelsen); Fas-assosiert faktor 1, FAF1 (US 5 750 653; ansett som del av beskrivelsen). Også omfattet for bruk i disse aspekter ifølge oppfinnelsen er tilveiebringelsen av interleukin-1 β -konverterende enzym og familiemedlemmer, også rapportert å stimulere apoptose.

Forbindelser som karbostyrilderivater (US 5 672 603; og 5 464 833; ansett som del av beskrivelsen); forgrenede apogeniske peptider (US 5 591 717; ansett som del av beskrivelsen); fosfotyrosininhibitorer og ikke-hydrolyserbare fosfotyrosinanaloger (US 5 565 491 og 5 693 627; ansett som del av beskrivelsen); agonister av RXR retinoidreseptorer (US 5 399 586; ansett som del av beskrivelsen); og også antioksidanter (US 5 571 523; ansett som del av beskrivelsen) kan også benyttes. Tyrosinkinaseinhibitorer som genistein, kan også linkes til ligander som sikter på en celleoverflatereseptor (US 5 587 459; ansett som del av beskrivelsen).

Effektive mengder

Forbindelsene som beskrives ovenfor blir fortrinnsvis administrert til et individ i en effektiv mengde. En effektiv mengde er en mengde som er i stand til å gi et ønsket resultat i et behandlet dyr eller en celle (for eksempel for å indusere apoptose eller forringe mitose i en celle i dyret eller en kultur). Som velkjent på det medisinske og veterinærmedisinske område, avhenger dosen for et hvert dyr av mange faktorer inkludert det spesielle dyrs

størrelse, kroppsoverflateareal, alder, det spesielle preparat som administreres, tid og vei for administrering, generell helse og andre medikamenter som administreres samtidig. Det er forventet at en egnet dose for topisk administrering av preparatet ifølge oppfinnelsen vil ligge i området rundt 1,5-4,0 mg KoQ10/kg kroppsvekt (for eksempel 200 mg for individer med en vekt på ca. 50 til ca. 150 kg). En effektiv mengde for bruk med en celle i kultur vil også variere men kan lett bestemmes empirisk (for eksempel ved å sette varierende konsentrasjoner til cellen og så velge den konsentrasjon som best gir det ønskede resultat). Det er ventet at en egnet konsentrasjon vil ligge innen området rundt 5-200 µM.

Metoder for inhibering av cancercellevekst

Oppfinnelsen tilveiebringer en metode for å inhibere tumorcellevekst eller å øke graden av tumorcelleapoptose. Metoden inkluderer å bringe en tumorcelle i kontakt med et preparat som inkluderer en tilstrekkelig mengde KoQ10 til å avlive eller minst forsinke mitose i tumorcellen. Metoden kan benyttes for å inhibere veksten av tallrike typer cancerøse tumorceller. Koenzym KoQ10 er testet og har vist seg å være effektiv mot melanom, skvamøs og brystcancerceller. Koenzym Q10 er forventet å være effektiv mot andre cancere også, særlig de som stammer fra epitelial, mesenkymal eller hemopoietisk opprinnelse.

Enhver egnet formulering av KoQ10 kan benyttes i oppfinnelsens metoder. Typiske formuleringer er topiske, liposomale formuleringer av koenzym Q10 med varierende konsentrasjoner. I tillegg til topisk administrering kan KoQ10-holdige formuleringer administreres til et individ via injeksjon (for eksempel IP, IV, IM, SQ).

I en metode for å redusere hastigheten av tumorcellevekst eller øke graden av tumorcelleapoptose *in vitro* blir KoQ10 oppløst i 2-propanol fulgt av fortynning i et ønsket medium (som beskrevet i eksempel 1 nedenfor). I en *in vivo*-metode for å redusere hastigheten av tumorcellevekst eller å øke graden av tumorcelleapoptose blir en KoQ10-holdig krem applikert topisk daglig på målsetet inntil det inntreffer tumorregresjon (som beskrevet i eksempel 2 og 3). I en annen *in vivo*-metode blir en KoQ10-holdig formulering administrert til et individ via injeksjon (for eksempel IP, IV, IM, SQ).

Inhibering av tumorcellevekst, manifestert ved administrering av KoQ10 preparater som beskrevet her, det vil si preparater omfattende rundt 1 til rundt 25 % koenzym Q10, henviser til en eller flere av de følgende effekter:

(1) inhibering, i en viss grad, av tumorvekst, inkludert (i) sinking og (ii) fullstendig vekststans;

(2) reduksjon i antallet tumorceller;

(3) opprettholdelse av tumorstørrelse;

(4) reduksjon i tumorstørrelse;

(5) inhibering, inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon, av tumorcelleinfiltrering i perifere organer;

5 (6) inhibering, inkludert (i) reduksjon, (ii) sinking eller (iii) fullstendig prevensjon av metastase;

(7) forsterkning av anti-tumor immunrespons som kan resultere i (i) opprettholdelse av tumorstørrelse, (ii) reduksjon av tumorstørrelse, (iii) sinking av veksten av en tumor, (iv) reduksjon, sinking eller prevensjon av invasjon; og/eller

10 (8) lindring, til en viss grad, av alvoret eller antallet av ett eller flere symptomer assosiert med forstyrrelsen.

I en foretrukket utførelsesform resulterer administrering av koenzym Q10-preparater i at en eller flere fenotyper av en tumorcelle inhiberes. For eksempel inhibering av tumorvekst, reduksjon av tumorstørrelse, inhibering av metastase, reduksjon i antallet tumorceller og
15 liknende. Hver av disse fenotyper av en tumorcelle kan måles ved bruk av standardanalyser som for eksempel avbildning, mekaniske målinger, *in vitro*-analyser og liknende.

Sett og formuleringer

Oppfinnelsen tilveiebringer også et sett for å redusere hastigheten av tumorvekst hos et individ. Settet ifølge oppfinnelsen inkluderer et preparat omfattende KoQ10 og en farma-
20 søytisk akseptabel bærer så vel som trykte instruksjoner for bruk av preparatet for å redusere hastigheten av tumorvekst i et individ.

Aktive komponenter kan være til stede i fast, halvfast eller flytende form. Faste former inkluderer for eksempel pulvere, granuler og flak. Halvfaste former inkluderer for eksempel geler, kremer, gelatiner og salver. Disse og andre aktive midler omfattet av oppfinnelsen er velkjente for fagmannen på området og er i de fleste tilfeller kommersielt tilgjengelige fra leverandører som Compound Solutions, Inc., Escondido, Ca, USA. Informasjon
25 om disse og andre aktive eller inaktive midler omfattet av oppfinnelsen, og deres kommersielle leverandører, er tilgjengelig fra forskjellige handelskataloger og spesielt Remington's Pharmaceutical Sciences, United States Pharmacopoeia (USP), National Formulary (NF), Merck Index, Physician's Desk Reference (PDR) og Chemical Abstracts.
30

Settene ifølge oppfinnelsen vil også generelt inneholde minst ett inaktivt middel. Inaktive midler som benyttet her, er midler som ikke gir noen terapeutisk fordel til individet hvortil de administreres. I stedet kan inaktive midler virke på mange andre måter for å gi en base

i hvilken det aktive middel kan oppløses eller suspenderes, å fortynne det aktive middel for å gi riktige doser ved administrering, for å lette oppløsningen eller suspenderingen av det aktive middel, eller å forhindre oksidering av det aktive middel ved å fjerne luftbobler fra den endelige komponerte suspensjon. I noen utførelsesformer av oppfinnelsen mangler settet et inaktivt middel og inneholder i stedet to eller flere aktive midler.

Basismidler som kremer, oljer, geler eller salver, er egnet for topiske eller suppositoriske applikasjoner. Valget av egnet, inaktivt basemiddel for bruk i settene ifølge oppfinnelsen vil avhenge av det aktive middel som skal komponeres. Egnede basismidler vil være velkjente for fagmannen. Alternativt kan Remington's Pharmaceutical Sciences, the Physician Desk Reference (PDR) eller andre manualer som angitt ovenfor, konsulteres ved slike avgjørelser.

Eksempler på inaktive basismidler eller komponenter inkluderer for eksempel lanolin, hydrofil salve, hvit salve, gul salve, polyetylenglykol salve, petrolatum, hydrofilpetrolatum, hvit petrolatum, rosevannsalve, squalen, hydrogenert vegetabilsk olje (type II), ultralydgel, pluronisk lecitinorganogel-(PLO-)gel, krem.

Uttrykket "petrolatum" som benyttet her betyr petrolatumsalve, petrolatumgel eller petrolatumkrem, alle kommersielt tilgjengelige. Det ligger godt innenfor fagmannens kunnskapsområde å bestemme hvilken form av petrolatum som er mest egnet for et spesielt sett.

En kommersielt tilgjengelig ultralydbase er enten POLYSONIC™ (ultralydgel) ultralydlotion eller Aquasonic ultralyd 100 gel fremstilt av Parker Laboratories, Inc. (Fairfield, N.J., USA), eller EcoGel 100 eller EcoGel 200 fremstilt av Eco-Med (Mississauga, Ontario, Canada), der preparatene kan inkludere cetylalkohol, flytende parafin, polymer, surfaktanter, preserveringsmiddel som propylparaben og metylparaben i bakteriostatisk konsentrasjoner, duft og revers osmosevann. Som benyttet her, er en gel en base med en høyere viskositet enn en lotion. De fysiske karakteristika for POLYSONIC™ (ultralydgel) ultralydlotion og EcoGel 100 inkluderer pH-området på 6,5-7,0, densitet på 1,04 g/cm³, viskositet på 35 000 til 70 000 cP og en akustisk impedans på 1,60 (10⁵ g/cm² s). De fysiske karakteristika for Aquasonic ultralyd 100 gel eller EcoGel 200 tilsvarer de til POLYSONIC™ (ultralydgel) ultralydlotion og EcoGel 100 bortsett fra at viskositeten er 80 000 til 110 000 cP. Disse lotioner og geler er tilgjengelige i en klar, fargeløs form eller i en blå, farget form.

Flytende baser anbefales for oralt administrerte farmasøytika. Innen utførelsesformer av oppfinnelsen vil minst en aktiv bestanddel, for eksempel KoQ10, leveres allerede blandet med et inaktivt middel. Eksempler på dette inkluderer kombinasjonen av magnesiumhydroksid og aluminiumhydroksid (kommersielt tilgjengelig som MAALOX™ (magnesiumhydroksid/aluminiumhydroksid)) og difenylhydramin HCl (kommersielt tilgjengelig som BENADRYL™ (difenyldraminhydroklorid)). Både MAALOX™ (magnesiumhydroksid/aluminiumhydroksid) og BENADRYL™ (difenyldraminhydroklorid) leveres av de respektive produsenter som en kombinasjon av aktive og inaktive midler.

Sterile baseoppløsninger er foretrukket for parenteral (det vil si injeksjon), aerosol (det vil si inhalering) og oftalmisk administrering. Administreringen kan for eksempel være intravenøs, intraperitoneal, intramuskulær, intrakavital, subkutan eller transdermal. Preparater for parenteral administrering inkluderer sterile vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner. De komponerte farmasøytika, fortrinnsvis de som er ment for parenteral, inhaleringsadministrering eller oftalmisk administrering, kan fremstilles og administreres i inaktive midler som er farmasøytisk akseptable. Som benyttet her betyr en farmasøytisk akseptabel bærer et ikke-toksisk materiale som ikke interferer med effektiviteten av den biologiske aktivitet av de aktive midler og som er kompatibel med de biologiske systemer som av et vev eller organisme. Den fysiologisk akseptable bæreren må være steril for *in vivo*-administrering. Farmasøytisk akseptable bærere inkluderer diluenter, fyllstoffer, salter, buffere, stabilisatorer, oppløseliggjørere og andre materialer som er velkjente på området. Egenskapene hos bæreren vil avhenge av administreringsvei. Generelt er farmasøytisk akseptable midler eller bærere velkjente for fagfolk på området. I noen utførelsesformer inkluderer sterile oppløsninger albuterol- og ipratropiuminhaleringsoppløsning; papaverin-, fentolamin- og prostaglandininjeksjonsoppløsning; fentanylcitratinjeksjonsoppløsning og cyklosporinoftalmiske dråper.

Eksempler på ikke-vandige oppløsningsmidler er propylenglykol, polyetylglykol, vegetabiliske oljer som olivenolje, en injiserbar, organisk ester som etyloliat. Vandige bærere inkluderer vann, alkohol/vandige oppløsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inkludert saltoppløsning og bufrede medier. Parenterale vehikler inkluderer natriumkloridoppløsning, Ringers dekstrose, dekstrose og natriumklorid, laktert Ringers eller fikserte oljer. Intravenøse vehikler inkluderer fluid- og næringssupplerere, elektrolytt-supplerere (som de som er basert på Ringers dekstrose) og liknende. Preserveringsmidler og andre additiver kan også være til stede som for eksempel antimikrobielle midler, antioksidanter, gelateringsmidler og inertgasser og liknende. Fagmannen på området kan lett bestemme de

forskjellige parametere for fremstilling av disse alternative, farmasøytiske preparater uten å måtte ty til urimelig eksperimentering.

Inaktive midler kan også inkludere komponenter som bevirker bevaring av integriteten av den komponerte formulering. Denne sistnevnte kategori av inaktive midler inkluderer for eksempel antiskummingsmidler. Antiskummingsmidler er midler som bevirker fjerning av uønsket luft fanget i et preparat, sannsynligvis under blanding eller agitering. Bruken av antiskummingskomponenter er særlig nyttig ved fremstilling av farmasøytika for anvendelse for ultralydabildning ved hjelp av impedansen av signaltransmisjon fra luftbobler. Eksempler på antiskummingsmidler som kan benyttes i preparatene ifølge oppfinnelsen, inkluderer bisfenylheksametikon, dimetikon, dimetikonol, heksametyldisiloksan, heksylalkohol, isopropylalkohol, petroleumdestillater, fenyletyldisiloksan, fenyltrimetikon, polysilikon-7, propylalkohol, silikadimetylsilylat, silikasilylat, tetrametyldecyndiol og trimetylsiloksysilikat. Et foretrukket antiskummingsmiddel er simetikon. Simetikon er en blanding av rundt 90 vektprosent dimetikon og 10 % silikondioksid (v/v). Simetikon benyttes i utstrakt grad som et antigassmiddel i farmasøytiske produkter som GAS-X™ (simetikon), MAALOX™ (magnesiumhydroksid/aluminiumhydroksid), MYLANTA™ (aluminum-, magnesiumsimetikon), PHAZYME™ (simetikon), GENAZYME™ (simetikon) og MYLICON™ (simetikon)dråper. Simetikon kan benyttes som antiskummingsmiddel i hvilke som helst av de formuleringer som omfattes av oppfinnelsen.

Andre inaktive midler som kan inkluderes i formuleringer ifølge oppfinnelsen inkluderer stabilisatorer som sitronsyre, antioksidanter som natriummetabisulfitt og preserveringsmidler som metyl- eller propylparaben.

En annen klasse inaktive midler er suspenderingsmidler. Slike er midler som letter suspenderingen og i enkelte tilfeller oppløsningen av et aktivt middel i en base. Generelt sikrer suspenderingsmidler en mer enhetlig blanding av aktive og basiskomponenter. For å administrere en mer enhetlig dose av et komponert farmasøytikum til en pasient må de sammensatte komponenter være riktig og homogent kombinert. Hvis det aktive middel er til stede som et pulver er en enhetlig dispergering noen ganger vanskelig å oppnå på grunn av den tradisjonelle sammenstillingsform.

En underkategori av suspenderingsmidler er oppløseliggjørere. Disse er midler som letter oppløsningen av et faststoff eller, i enkelte tilfeller, et halvfast middel i et inaktivt basismiddel. I enkelte utførelsesformer av oppfinnelsen kan det fastformaktive middel oppløses i et suspenderingsmiddel før blanding med basismiddelet. Omvendt kan suspenderings-

midlet og basismidlet forpakkes sammen, spesielt hvis man ønsker å sikre enhetlig blanding av aktivt middel med basiskomponenten, heller enn tapet av faststoff (det vil si pulverformig) aktivt middel. I ytterligere variasjoner kan suspenderingsmidlet forblendes med et inaktivt basismiddel.

- 5 Egnede suspenderingsmidler som er nyttige i preparatene ifølge oppfinnelsen, inkluderer, men er ikke begrenset til glyserin, heksylglykol, propylenglykol, sorbitol, akasia, kolesterol, dietanolamin (adjunkt), glycerylmonostearat, lanolinalkoholer, lecitin, mono- og diglyserider, monoetanolamin (adjunkt), oljesyre (adjunkt), oleylalkohol (stabilisator), poloksamer, polyoksyetylen 50 stearat, polyoksy 35 ricinusolje, polyoksy 40 hydrogenert ricinusolje, 10 polyoksy 10 oleyleter, polyoksy 20 cetostearyleter, polyoksy 40 stearat, polysorbat 20, polysorbat 40, polysorbat 60, polysorbat 80, propylenglykoldiacetat, propylenglykolmonostearat, natriumlaurylsulfat, natriumstearat, sorbitan monolaurat, sorbitan monooleat, sorbitan monopalmittat, sorbitan monostearat, stearinsyre, trolamin, emulgerende voks, benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, cetylpyridiniumklorid, dokusatnatrium, nonoksynol 9, 15 nonoksynol 10, oktoksynol 9, polyoksy 50 stearat og tyloksapol.

Ytterligere andre suspensjonsmidler inkluderer fuktere og humektanter. Humektanter er midler som opprettholder fuktigheten. Eksempler på slike inkluderer, men er ikke begrenset til glyserin, heksylenglykol, propylenglykol og sorbitol. Mengdene av base- og ikke-baseinaktive midler blir også avhengig av det spesielle, komponerte farmasøytikum som fremstilles. Basemidler kan tilveiebringes i mengder tilsvarende slutt sammenstilte prepa- 20 raten som inneholder 0,5 til 99,99 % basemiddel, enten på vekt- eller volumbasis. I foretrukne utførelsesformer er sluttkonsentrasjonen av basismiddel 20-80 %, og i enda mer foretrukne utførelsesformer er den 40-80 %.

Generelt vil mengden av ikke-basismidler være tilstrekkelig til å gi en sluttformulering i 25 hvilket ikke-basis inaktivt middel representerer 0,01-50 vektprosent av preparatet. Suspensjonsmidler kan representere 1-50 vektprosent av sluttformuleringen. Fortrinnsvis vil suspensjonsmidlet representere 1-40 % og mer foretrukket 5-30 % av sluttformuleringen. Antiskummingsmidler kan representere 0,01 til 20 vektprosent av sluttformuleringen. Mer spesielt representerer antiskummingsmidler 0,05 til 10 % av sluttformuleringen og aller 30 helst 0,1 til 5 % av sluttformuleringen.

I visse, foretrukne utførelsesformer er den enkle eller multiple bruk av sett ment for, etter fysisk blanding av aktive og inaktive midler, sammensatte farmasøytiske formuleringer omfattende 1, 5 10 eller 20 vektprosent KoQ10.

Settene ifølge oppfinnelsen vil tilveiebringe hver enkel komponent som kreves for å fremstille en gitt, sammensatt farmasøytisk blanding, i på forhånd tilmålte mengder. Tilmålingen av hver komponent vil gjennomføres ved bruk av vanlig god fremstillingspraksis (cGMP som fastlagt av "the Code of Federal Regulations" eller CFR), på samme måte som pakking og merking av hver komponent og sluttpakking og merking av sett i sin helhet. På denne måte blir settene standardisert og variasjon fra sats til sats vil bli minimale eller ikke-eksisterende, og nøyaktigheten og presisjonen ved målingen av individuelle komponenter vil forbedres betydelig i forhold til de metoder som i dag benyttes av farmasøyster. Instruksjoner kan tilveiebringes separat fra enhver beholder, men allikevel være inneholdt i settet. Alternativt kan instruksjoner være lokalisert på en beholder, for eksempel på den ytre overflate eller en indre overflate som et lokk.

De aktive og de inaktive midler av settet tilveiebringes i beholdere. Fordi settet vil inneholde minst et aktivt og minst et inaktivt middel, eller minst to aktive midler som er preformulert med inaktive midler, vil det minimale antall av beholdere i et gitt sett være to. I foretrukne utførelsesformer vil det maksimale antall beholdere i et sett være lik eller mindre enn fire. Beholderne kan være tildannet i en hvilken som helst størrelse eller form som er nyttig for blanding eller overføring av komponentene fra en beholder til en annen. For eksempel kan hver beholder være i form av vialer, flasker, trykkflasker, krukker, forseglede beholdere, konvolutter eller poser, rør eller blisterpakker eller hvilke som helst andre egnede former forutsatt at beholderen er forseglet for å forhindre prematur blanding av komponentene. Som benyttet her kan en beholder også være et rom eller et kammer i en vial, et rør, en krukke eller en konvolutt, eller en annen pakke eller blisterpakke eller flaske, forutsatt at innholdet av et rom ikke er i stand til å forenes fysisk med innholdet i et annet rom før den tilsiktede blanding ved en farmasøyt eller lege.

Oppfinnelsen tar sikte på, i et enkelt sett, å tilveiebringe alle de nødvendige komponenter, beholdere og omrørings- eller blandeelementer for fremstilling av en enhet av brukskomponert farmasøytikum uten behov for andre hjelpestoffer. Settene ifølge oppfinnelsen kan også inneholde elementer som hansker eller elementer for oppfangning av søl. Individuer som kjenner denne teknikk kan lett modifisere valget av beholder for tilpasning til forskjellige komponenter som innholdet så blandes deri.

I visse utførelsesformer av oppfinnelsen vil den sluttkomponerte formulering tilveiebringes til pasienten i beholderen som i utgangspunktet inneholdt den inaktive forbindelsen eller basisforbindelsen. I en annen utførelsesform vil den sluttkomponerte formulering tilveiebringes i beholderen som opprinnelig huset det aktive middel. I ytterligere utførelsesfor-

mer er alle nødvendige komponenter for fremstilling av et sammensatt farmasøytikum inkludert i en beholder, men er fysisk separerte i en slik beholder. For eksempel kan et inaktivt middel inneholdes i den nedre del av en beholder som en krukke, og kan dekkes av et plastlokk, for eksempel et avtrekkbart slikt. Det aktive middel kan huses i den samme krukke, men være festet til krukkenes lokk og tilveiebrakt i en pose eller en hylse. Muligheten for å tilveiebringe alle komponenter sammen i det minst mulige emballasjearrangement kan under visse omstendigheter være foretrukket. Blandingen av elementene som er nødvendig ved fremstilling av det sammensatte farmasøytikum, kan også være lokalisert i samme beholder, for eksempel festet til den innvendige overflate av beholderens lokk.

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen tilveiebringes det aktive og inaktive midler i ved siden av hverandre liggende rom i en enkelt husbeholder, som mekanisk fjernes fra disse rom og inn i et tredje rom. Som et eksempel kan alle de kjemiske komponenter som er nødvendige for å fremstille et spesielt, sammensatt farmasøytikum, være til stede i et enkelt rør, for eksempel et rør tilsvarende en tannpastatube med et indre som er delt i separate rom. Hvert av disse rommene huser i sin tur et basismiddel eller et aktivt middel. Enten kan basismidlet eller det aktive middel forblendes med et antiskummingsmiddel og/eller et suspensjonsmiddel som beskrevet her. Ved å legge trykk på røret som en helhet, kan komponentene presses ut av de respektive rom. De kan så blandes enten i et naborom eller et fysisk separat rom. Utpressing eller tilsvarende på den ytre overflate av røret kan være alt som er nødvendig for å fange opp de individuelle komponenter som inneholdes i røret. I nok en utførelsesform kan innholdene i begge kamre i en beholder pumpes ut og inn i en tredje beholder. I et relatert rom er det også tatt sikte på at i stedet for å kreve at innholdet i hvert trer ut av dette og strømmer inn i et tredje rom kan komponentene separeres av en fjernbar folie eller film. Således er, ved fjerning av en slik folie eller film, innholdet i de to rom i kontakt og kan kreve kun agitering eller invertering oppned for fullstendig blanding. Denne siste utførelsesform vil eliminere behovet for et blandeelement og er velegnet for en ytre pakke spesielt hvis instruksjonene er skrevet på selve beholderen.

I henhold til noen aspekter ved oppfinnelsen kan hver beholder inneholde ett eller flere aktive midler eller ett eller flere inaktive midler. For eksempel behøver, i noen utførelsesformer av oppfinnelsen, ingen av beholderne å inneholde både et aktivt og et inaktivt middel før blanding. Imidlertid tilveiebringer oppfinnelsen også sett der beholderen kan inneholde ett aktivt og minst ett inaktivt middel som et basismiddel, et suspenderingsmiddel eller et antiskummingsmiddel.

I en foretrukket utførelsesform blir det aktive middel tilveiebrakt på forhånd blandet med et inaktivt middel. Dette gjelder hovedsaklig når KoQ10 er kommersielt tilgjengelig som et faststoff, for eksempel et pulver, og forblandingen av pulveret med et suspenderingsmiddel letter legens eller farmasøytens komponering. I nok en utførelsesform kan minst to av de inaktive midler være forblandet som tilveiebrakt i settene ifølge oppfinnelsen.

I noen utførelsesformer der det aktive middel er tilsatt basiskomponenten kan det være ønskelig å tilveiebringe basiskomponenten i en beholder som kun delvis er full. I foretrukne utførelsesformer er beholderen i hvilken basiskomponenten befinner seg mindre enn 100 volumprosent full. I andre utførelsesformer er beholderen 95, 90, 80, 75, 70, 60, 50, 40, 30, 20 eller mindre enn 20 volumprosent full. I andre utførelsesformer omfatter de aktive eller inaktive midler ett volum av de respektive beholdere som går fra 100 % til mindre enn 1 %, og hvert hele tall der i mellom. I foretrukne utførelsesformer opptar det inaktive middel et volum av den andre beholder som er lik mindre enn volumet av den andre beholder minus volumet av det aktive middel.

Som benyttet ifølge oppfinnelsen blir de aktive og inaktive midler fysisk kombinert av en farmasøyt for å gi et sammensatt farmasøytikum. Komponentene i settet kan kombineres ved mild agitering, risting, omrøring, vending opp-ned eller tilsvarende av den første eller andre beholder. I enkelte tilfeller kan egnet blanding av aktive og inaktive midler gjennomføres ganske enkelt ved tilsetning av den ene til den andre, fulgt av forsegling og omrøring av beholderen. Dette er spesielt tilfelle hvis komponentene begge er væsker eller begge er halvfast stoffer. I andre tilfeller kan det være nødvendig å omrøre komponentene sammen med et blandeelement. Blandeelementer er velkjente for fagfolk på området og kan inkludere for eksempel sentrifuger, en blandestav slik som en glasstav, en skje, en spatel eller en dyppinne. Hvis nødvendig tilveiebringes blandeelementet i settet. Nærværet av et blandeelement vil variere avhengig av den sammensatte, farmasøytiske formulering for fremstilling med komponenter i et sett.

Det sluttkomponerte farmasøytikum kan formuleres til preparater i fast, halvfast, flytende eller gassform som tabletter, kapsler, pulvere, granuler, salver, oppløsninger, suppositorier, inhalanter og injeksjoner, og vanlige veier for oral, parenteral eller kirurgisk administrering. Oppfinnelsen omfatter også lokal administrering av de sammensatte farmasøytika ifølge oppfinnelsen, for eksempel som implantater. Disse formuleringer kan være ment for oral, topisk, mukosal, parenteral (for eksempel injiserbar), rektal eller vaginal administrering. I foretrukne utførelsesformer kan de sluttkomponerte formuleringer være selvadministrert.

Settene ifølge oppfinnelsen kan også inneholde en pakke som kan være oppdelt i rom for på denne måte å inneholde to eller flere beholdere ifølge oppfinnelsen. I noen utførelsesformer kan pakken være i form av en eske, fremstilt av et moderat stivt materiale som papp eller innpakningspapir. I andre utførelsesformer kan pakken være en pose. I ytterligere utførelsesformer og som beskrevet her er det ingen ekstern innpakning og alle beholdere kan være innarbeidet i en av beholderne som huser et aktivt eller et inaktivt middel. Denne siste utførelsesform kan gjennomføres ved å feste beholdere som poser, hylser eller sekker, inneholdende enten aktive eller inaktive midler, så vel som alle blandeelementer som kreves for komponeringen, til det indre lokk av hovedbeholderen. Et individ med kunnskap på området kan lett modifisere pakken for tilpasning til individuelle behov for hvert sett og hver bruk. Settene ifølge oppfinnelsen kan videre inneholde instruksjoner for riktig bruk av komponentene som finnes deri.

Settene ifølge oppfinnelsen er ment for bruk ved terapi eller prevensjon av et antall forstyrrelser i et antall individer inkludert mennesker, hunder, katter, hester, fisk, svin, kyr, sauer, rådyr, dyr i zoologisk hage og laboratoriedyr (for eksempel mus, rotter, kaniner, aper og så videre). Oppfinnelsen tar sikte på å omfatte enheter av brukssett inneholdende de ovenfor angitte preparater.

De følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen uten å begrense den. Selv om spesifikke eksempler er tilveiebrakt, er beskrivelsen ovenfor kun illustrerende og ikkebegrensende. Et hvilket som helst eller flere av trekkene av de tidligere beskrevne utførelsesformer kan kombineres på en hvilken som helst måte med ett eller flere trekk av en hvilken som helst annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen. Videre vil mange variasjoner av oppfinnelsen være åpenbare for fagmannen på området ved et studium av beskrivelsen. Rammen for oppfinnelsen skal derfor bestemmes ikke under henvisning til beskrivelsen ovenfor men i stedet bestemmes under henvisning til de vedlagte krav sammen med det fulle område av ekvivalenter.

Alle publikasjoner og patentdokumenter som er angitt i beskrivelsen anses som del av denne for alle formål. Det er ikke ment at en angivelse av forskjellige referanser skal tolkes som en innrømmelse om at disse utgjør noen som helst slags form for "kjent teknikk".

Eksempler

De følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen uten å begrense den. Det skal være klart at variasjoner og modifikasjoner kan foretas uten å gå utenfor oppfinnelsens ånd og ramme.

Eksempel 1- Materialer og metoder for apoptoseanalyse

Cellelinjer som benyttes i analysen var SK-Mel28 og nFIB. Celler (SK-Mel28 og nFIB) ble sådd ut med (5×10^4 celler/brønn) i brønner inneholdende enten kun medium eller medium med behandling og plassert i en inkubator ved 37°C, 5 % CO₂, og under fuktede betingelser i 48 timer. Hver tilstand ble gjennomført i duplikat og var gjenstand for følgende protokoll:

Apoptoseanalyse i henhold til protokollen ifølge BD Pharmingen Annexin-VPE Protocol

Reagenser inkluderer Annexin V-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), 7-AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA), bindingsbuffer (10 x: 0,1 M HEPES/NaOH, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) [fortynnet til 1 x (9 ml PBS og 1 ml bindingsbuffer) for bruk i forsøket] (BD Pharmingen, San Diego, CA), trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY), og ønskede medier.

0,5 ml trypsin settes til hver brønn, trypsin fjernes etter ca. 10 s og det tilsettes 0,5 ml trypsin til hver brønn. Brønnene anbringes i en inkubator og nivået av løsgjøring observeres under mikroskop etter 4 min og det dunkes forsiktig til brønnenes sider og bunner for å understøtte løsgjøring. Mens cellene løsgjøres nøytraliseres det hele med 0,5 ml serum-supplert medium. Celleoppløsningen overføres til sentrifugerør og cellene sentrifugeres ved 2 000 omdreininger per min i 5 min, supernatant suges av, det hele resuspenderes i 6 ml PBS og 6 ml splittes til tre sentrifugerør med 2 ml hver. Cellene sentrifugeres ved 2 000 omdreininger per min i 5 min, supernatanten suges av, resuspenderes i 100 µl bindingsbufferblanding, det tilsettes 50 µl Annexin V-PE og 50 µl 7-AAD til hvert sentrifugerør og det slynges og anbringes i mørket i 15 min. 350 µl bindingsbuffer settes til hvert rør og det gjennomføres analyse ved bruk av strømningscytometeret.

Det ble også satt opp en bunnlinje ved bruk av nydyrkede celler fra en kolbe. Cellene ble subdyrket og vasket to ganger med kald PBS. Deretter ble de resuspendert i 1 x bindingsbuffer til en konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml. 100 µl av celleduspensjonen ble overført til tre testrør med til sammen 1×10^5 per rør. Et rør tjente som negativ kontroll uten at farging ble innført. Et ytterligere ble farget med kun AnnexinV-PE mens det siste ble farget kun med 7-AAD. 50 µl av fargingsoppløsningen ble anbrakt i hvert av rørene. Disse rør ble så anbrakt i mørket i 15 min hvorefter 350 µl bindingsbuffer ble satt til hvert. De ble så underkastet analyse ved strømningscytometri før tilsetning til de behandlede og kontrollcellene.

Forsøk 1: Effekten av koenzym Q10 på nivået av apoptose i human brystcancer-
ler

MCF-7 Kontroll	MCF-7 Kontroll	MCF-7 Kontroll
100 µM KoQ10	100 µM KoQ10	100 µM KoQ10

- Sådd ut med 50 000 celler/brønn
- Sammenlikning med bunnlinje av 100 000 celler/prøve i apoptoseanalysen (Annexin PI) etter 72 timer

5

Forsøk 2: Effekten av 2-propanolvehikkel på nivået av apoptose i melanomceller

SK-MEL 28 Kontroll	SK-MEL 28 Kontroll	SK-MEL 28 Kontroll
Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)	Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)	Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)

- Sådd ut med 50 000 celler/brønn
- Sammenlikning med bunnlinje av 100 000 celler/prøve i apoptoseanalysen (Annexin PI) etter 48 timer

10

Forsøk 3: Effekten av 2-propanolvehikkel på nivået av apoptose i neonatale fibroblaster

nFIB (P) 6 Kontroll	nFIB (P) 6 Kontroll	nFIB (P) 6 Kontroll
Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)	Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)	Ekvivalent volum hvis 50 µM KoQ10 (1 % 2-propanol)

- Sådd ut med 50 000 celler/brønn
- Sammenlikning med bunnlinje av 100 000 celler/prøve i apoptoseanalysen (Annexin PI) etter 48 timer

15

Fremstilling av DMEM/F12 medium

Materialer:

- DMEM/F12 medium (kat# 11330-032 Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)

- Silikonisert sterile pipettespisser – 1ml og 25 ml for anvendelse ved PipettMan
- FBS (føtalbovinserum) supplement (Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)
- PSA (penicillinstreptomycinamfoterocin B) – antimikrobielt middelsupplement (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR)

5 Prosedyrer:

En egnet mengde FBS overføres til DMEM/F12 (for eksempel 50 ml FBS i 500 ml medium for 10 % serumkonsentrasjon). En egnet PSA tilsettes for å oppnå en oppløsning med en sluttkonsentrasjon på 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycinsulfat og 0,25 µg/ml amfotericin B (for eksempel 1 ml av 500 x PSA i 500 ml medium). Det hele blandes ved
10 pipettering og vending av kolbe opp-ned. Det hele lagres ved 4°C til bruk.

Fremstilling av EpiLife Medium

Materialer:

- Silikonisert sterile pipettespisser – 5 ml, 10 ml for anvendelse med PipettMan
- EpiLife medium (M-EPI-500, Cascade Biologics)
- 15 - PSA (500X penicillinstreptomycinamfoterocin B) – antimikrobielt middel supplement (R-004-10 Cascade Biologics)
- EDGS (epidermalvekstsupplement) (S-012-5 Cascade Biologics)

Prosedyrer:

En vial av 5 ml EDGS og 1 ml PSA overføres til EpiLife medium, noe som resulterte i 100
20 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycinsulfat og 0,25 µg/ml amfotericin B (for eksempel 1 ml av 500 X PSA i 500 ml medium). Det hele blandes ved pipettering og konvertering. Det hele lagres ved 4°C inntil bruk.

Dannelse av en homogen oppløsning av Q10 i mediumprotokollmaterialer:

- 25 - Polystyren sterile pipettespisser – 200-1 000 µM for anvendelse med automatiske pipetter
- Silikoniserte sterile pipettespisser – 10 ml for anvendelse med PipettMan
- 15 ml sentrifugerør
- Medie
- Koenzym Q10 (Compound Solutions, Inc., Escondido, CA)
- 30 - 2-propanol (kat.nr. 9083-3, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsbury, NJ)

Prosedyrer:

Q10 hentes fra -20°C lageret og veies ut i en mengde rundt 4,4 mg. Q10 overføres til et 25 ml sentrifugerør. 1 ml 2-propanol settes til sentrifugerøret. Det hele slynges og dryppes i varmt vann (55°C) for å fremme oppløsning. 9 ml medium settes til sentrifugerøret. Det hele vortekseres og dryppes i varmt vann (55°C) hvis nødvendig for å danne en homogen oppløsning. Dette resulterer i en 500 µM Q10-oppløsning. Det foretas seriefortynninger til behandlingskonsentrasjoner.

Protokoll for opptining av celler

- Silikoniserte sterile pipettespisser – 1 ml, 10 ml for anvendelse med PipettMan
- 75 cm² cellekulturkolber
- 15 ml sentrifugerør

Prosedyrer:

Reagensene akklimatiseres til 37°C i vannbad. Celler gjenvinnes fra en tank med flytende nitrogen. Vialene holdes i en lukket hånd for å initiere opptining. De senkes ned i vannbad til 37°C inntil fullstendig smelting. Cellene overføres til et 15 ml sentrifugerør med 10 ml vektmedium. Det hele blandes ved pipettering. Det sentrifugeres i 8 min ved 2 500 omdreininger per min, og supernatanten suges av. Pelleten resuspenderes med egnet medium. Det hele blandes ved vorteksering og pipettering for å homogenisere celleduspensjonen. Det hele overføres til 75 cm² cellekulturkolber.

SubdyringscelleprotokollMaterialer:

- Silikonisert sterile pipettespisser – 5 ml, 10 ml for anvendelse med PipettMan
- 75 cm² (T75) cellekulturkolber
- 6 brønns vevskulturplater
- 15 ml sentrifugerør
- Medier
- 0,05 % trypsin (kat.nr. 25-052-C1. 1X trypsin-EDTA, Cellgro by Mediatech, Herndon, VA)

Prosedyrer:

Reagenser akklimatiseres til 37°C i vannbad. Medium fjernes fra cellekulturkolbene (cellene er ferdige for subkultur når de er omtrent 85 % konfluente). Det hele primes ved tilsetning av 1-2 ml trypsin til kolben i 30 sek. Trypsin fjernes fra kolben. 5 ml trypsin settes til kolben. Kolben plasseres i en inkubator ved 37°C i rundt 4 min. Man fjerner og observerer

graden av løsgjøring under mikroskop. Hvis nødvendig knipser man forsiktig kolben for å understøtte løsgjøring. 5 ml serumholdig medium tilsettes. Det hele blandes ved pipettering og vasking av kolben med cellesuspensjon. Cellesuspensjon overføres til et 15 ml sentrifugerør. Sentrifugerøret vortekseres. Det hele sentrifugeres ved 2 500 omdreininger per min i 8 min. Supernatanten suges av. Pelletene resuspenderes i egnet medium og det dannes en homogen cellesuspensjon ved pipettering og vorteksering. Cellene såes ut i nye T75 kolber eller i brønnplater for forsøk.

Protokoll for telling av celler

Materialer:

- Beckman Coulter® Z1 celle- og partikkelteller (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)
- Coulter Counter vialer (Beckman Coulter, Inc.)
- Isoton II diluent (#8546719), Beckman Coulter)
- Coulter CLENZ (#8546929, Beckman Coulter)
- Polystyrensteril pipettespisser -20-200 µM, 200- 1 000 µM for anvendelse med automatiske pipetter.

Prosedyrer:

Etter subdyrking (per protokoll for subdyrking av celler som beskrevet ovenfor), pipetteres det ønskede volum av suspensjonen av celler for telling (0,25-1 ml) i en Coulter Counter Vial (Beckman, Inc.) ved bruk av en automatisk pipette. Det sikres at Beckman Coulter® Z1 celle- og partikkeltelleren er ren ved å benytte Coulter CLENZ (Beckman, Inc., Fullerton, CA) for skylling. Apparaturen skylles en gang med isoton II diluent. Isoton II diluent settes til beholderen inneholdende cellene for et totalvolum på 10 ml. Apparaturens utgangsmodus benyttes for å telle cellene to ganger for å sikre nøyaktighet. Midlet av tellingene beregnes og det totale celleantall beregnes per volum.

Protokoll for gjennomføring av *in vitro*-forsøk

Materialer

- Polystyren sterile pipettespisser 20-200 µM, 200- 1 000 µM for anvendelse med automatiske pipetter
- Silikoniserte sterile pipettespisser – 5 ml, 10 ml for anvendelse med PipettMan
- 75 cm² cellekulturkolber
- 6 brønners vevkulturplater
- 15 ml sentrifugerør

- Coulter Counter vialer (Beckman Coulter, Inc.)
- 0,05 % trypsin (kat.nr. 25-052-C1- 1X trypsin-EDTA, Cellgro)

Prosedyrer:

Reagensene akklimatiseres til 37°C i et vannbad. Det tildannes en forholdsoppløsning av Q10 i henhold til protokollen som beskrevet ovenfor for å skape en homogen oppløsning av Q10 i medium. Det gjennomføres seriefortynninger til ønskede konsentrasjoner og 2 ml medium anbringes i respektive celler. Kolbene subdyrkes i henhold til protokollen som beskrevet ovenfor for subdyrking av celler og celler resuspenderes med akkurat tilstrekkelig medium til å skape en homogen cellesuspensjon (rundt 5 ml). Cellekonsentrasjonen bestemmes i henhold til protokollen som beskrevet ovenfor for telling av celler. Cellesuspensjonen fortynnes slik at den ønskede mengde av celler som skal såes ut inneholder 50 -100 µl. Den ønskede mengde celler såes ut i hver brønn og det hele inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ under fuktige betingelser for ønsket varighet. Medium suges av fra cellene og 0,5 ml trypsin anbringes i hver brønn hvorefter det hele inkuberes i rundt 4 min. Graden av løsgjøring understøttes under mikroskop. Det hele slynges, sidene knipses forsiktig og bunnen knipses forsiktig for å understøtte løsgjøring hvis dette er nødvendig. Trypsin nøytraliseres med 0,5 ml medium. Det hele pipetteres for å understøtte celleløsgjøring og oppbryting av klumper. 0,5 ml cellesuspensjon fjernes og anbringes i Coulter Counter vialer (Beckman Coulter, Inc.). Cellene telles i henhold til protokollen ovenfor for telling av celler.

Protokoll for inokulering av dyr

Materialer:

- Fosfatbufferoppløsning (PBS) (Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)
- Polystyrensterile pipettespisser 20-200 µM, 200- 1 000 µM for anvendelse med automatiske pipetter
- Silikoniserte, sterile pipettespisser – 5 ml, 10 ml for bruk med PipettMan
- 75 cm² cellekulturkolber
- 15 ml sentrifugeringsrør
- Coulter Counter vialer (Beckman Coulter Inc.)
- 0,05 % trypsin (kat.nr. 25-052-C1- 1X trypsin-EDTA, Cellgro)
- Sentrifugerør (2 ml)
- Anestetikum (Aventin)

Prosedyrer:

Kolbene subdyrkes i henhold til protokollen for subdyrking av cellene som beskrevet ovenfor. Etter avsugning av supernatant kombineres cellene fra hver kolbe, lett fortynnet med PBS, med en 5 ml pipette. Den endelige cellesuspensjon fortynnes til å inneholde rundt 10 millioner celler per 100 μ l. Cellesuspensjonen overføres til mikrosentrifugerør (2 ml). Det hele plasseres umiddelbart i is og forblir på is til injeksjon. Mus anestetiseres med en intraperitoneal injeksjon med 0,3 cm³ Aventin. Hvert dyr inokuleres subkutan med 0,1 cm³ cellesuspensjon per sete. Gjenværende celler overføres til et 15 ml sentrifugerør og fortynnes til 10 ml med medium. Det hele sentrifugeres ved 2 500 omdreininger per min i 8 min. Supernatanten suges av og det settes 10 ml medium til sentrifugerøret. Det tildannes en homogen cellesuspensjon ved pipettering og vorteksering. Cellene såes ut i en T75 kolbe for å sikre forsøkscellelevedyktighet.

Eksempel 2 - Effekt av en topisk formulering av koenzym Q10 på SK-MEL28 tumorer i mus

Melanomtumorer ble induisert i mus ved SK-MEL28 injeksjon i det subkutane sjikt. Dyrestudien bestod av både en kontroll- og behandlingsgruppe, hver inneholdende fire mus. Musene ble inokulert med to tumorer, og grafen i figur 14 representerer den resulterende, midlere masse for tumorer i hver mus. En topisk formulering av Koenzym Q10 (10 %) ble brakt på tumorene i behandlingsgruppen daglig i et tidsrom på 30 dager. Deretter ble tumorene skåret ut og massen bestemt. Differansen i total midlere masse for behandlingsgruppen var signifikant sammenliknet med kontrollen ($P < 0,05$).

Eksempel 3- fremstilling av topisk KoQ10 kremReagenser:

- Fosfolipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT)
- Glycerol
- BHT
- Etanol
- MCT
- Lavendel (Sigma-Aldrich)
- KoQ10 (Pure Prescriptions, San Diego, CA)

Prosedyre:

6 g fosfolipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT) ble oppløst i en blanding av 5,8 g glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,2 g BHT (Sigma-Aldrich), 4 ml etanol (Sigma-Aldrich) og 18 g MCT (Sigma-Aldrich) ved 60°C. 20 g CoQ10 (Pure Prescriptions) ble
 5 oppløst i den resulterende blanding. 90 ml 1mM fosfatbuffer (pH 8,2), preparert med nitrogenmettet vann og 0,2 ml lavendel (Sigma-Aldrich) ble tilsatt og bandingen blandet i en høyhastighetsblander ved 12 000 omdreininger per min for å danne en krem. Denne ble lagret ved 4°C inntil bruk.

Eksempel 4: Apoptoseanalyse for JC-1 farging

Apoptose ble målt ved bruk av et mitokondrialt membranfargestoff JC-1, 5,5', 6,6'-tetraklor-1,1',3,3'-tetraetyl-benzimidazolylkarbocyaninklorid (Molecular Probe), Eugene, OR, USA). Behandlinger omfattende DMEM-F12 medium supplert med 1X PSA, 5 % FBS og 0, 50, 100 og 200 µM konsentrasjoner av koenzym Q10 ble preparert i 60 x 15 ml vev-
 15 kulturskåler (Costar-Cambridge, MA, USA). PC-3 celler ble sådd ut med 500 000 celler per skål og inkubert i 24 timer. Cellene ble trytinisert ved bruk av 2 ml trypsin-EDTA og underkastet sentrifugering ved 2 500 omdreininger per min i 8 min. De ble resuspendert i 1 ml Ham's F12 medium som manglet serum og fenolrødt (Cascade Biologics, Inc-Portland, OR, USA) og umiddelbart anbrakt på is. En 1 mg/ml forholdsoppløsning av JC-1 ble pre-
 20 parert ved bruk av steril DMSO, og 10 µl ble satt til hver celleduspensjon under forsiktig vorteksering. Cellene ble inkubert ved 37°C i 15 min, fortynnet med 4 ml Ham's F12 medium og sentrifugert ved 600 omdreininger per min i 7 min. Resuspendert i 5 ml kald PBS (Gibco-Grand Island, NY) ble cellene sentrifugert igjen ved 600 omdreininger per min i 7 min. Cellepelletten ble så suspendert i 1 ml kald PBS og overført til nylonfilteroppstrø-
 25 ningscytometrirør dekket med folie for å forhindre lyspenetrering. Prøvene ble analysert ved strømningscytometri med henblikk på forandringer i opptaket av fluorescensfargestoff. Monomer JC-1 viser grønn fluorescens ($\lambda_{em} = 527$ nm) mens J-aggregater viser rød fluorescens ($\lambda_{em} = 590$ nm). Permeabiliserte mitokondrier akkumulerer JC-1 monomerfargestoffet før og under apoptose.

Andre utførelsesformer

Det skal være klart at mens oppfinnelsen er beskrevet i forbindelse med den detaljerte beskrivelse, er beskrivelsen ovenfor ment å illustrere og ikke å begrense oppfinnelsens

ramme slik den er definert i de vedlagte krav. Andre aspekter, fordeler og modifikasjoner ligger innenfor rammen av de følgende krav.

P a t e n t k r a v

1. Preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter ko-enzym Q10 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
- 5 2. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet omfatter koenzym Q10, fosfolipon 90, glyserol, butylert hydroksytoluen (BHT), etanol, middelkjedede triglycerider (MCT), og lavendel.
3. Preparat ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfolipon 90 er fosfolipon 90G.
- 10 4. Preparat ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfolipon 90 er fosfolipon 90H.
5. Preparat ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter fosfolipon 90G og fosfolipon 90H.
6. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet omfatte mellom rundt 1 og rundt 25 vektprosent koenzym Q10.
- 15 7. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet omfatte mellom rundt 1 og rundt 20 vektprosent koenzym Q10.
8. Fremgangsmåte for behandling av en cancerpasient, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at den omfatter:
administrering til en pasient som trenger det, av et preparat omfattende
20 en terapeutisk effektiv mengde av koenzym Q10;
å bringe en tumorcelle i kontakt med preparatet for å oppnå lysering av
tumorcellen;
for derved å behandle cancerpasienten.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d
25 at preparatet omfatter rundt 1 til rundt 25 vektprosent koenzym Q10.
10. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d
at preparatet omfatter rundt 1 til rundt 20 vektprosent koenzym Q10.
11. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d
at preparatet omfattende koenzym Q10 er formulert som en topisk krem.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at en terapeutisk effektiv mengde av koenzym Q10-preparatet administreres sammen med ett eller flere kjemoterapeutiske midler.
- 5 13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kjemoterapeutiske middel kan administreres samtidig med, før eller etter administrering av preparatet omfattende en terapeutisk effektiv mengde av koenzym Q10.
- 10 14. Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kjemoterapeutiske middel er valgt fra gruppen bestående av cyklofosfamid (CTX, 25 mg/kg/dag, *p.o.*), taksaner (paklitaksel eller docetaksel), busulfan, cisplatin, cyklofosfamid, metotreksat, daunorubicin, doksorubicin, melfalan, kladribin, vinkristin, vinblastin og klorambucil.
- 15 15. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at behandlingen resulterer i inhibering av tumorcellevekst.
16. Fremgangsmåte for inhibering av tumorcellevekst i et individ, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter administrering til individet av et farmasøytisk preparat omfattende koenzym Q10.
- 20 17. Fremgangsmåte ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat omfatter mellom rundt 1 til rundt 25 vektprosent koenzym Q10.
18. Fremgangsmåte ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 25 vektprosent koenzym Q10.
- 25 19. Fremgangsmåte ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 20 vektprosent koenzym Q10.
20. Fremgangsmåte for indusering av apoptose i en tumorcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter administrering av et farmasøytisk preparat omfattende koenzym Q10.

21. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 25 vektprosent
koenzym Q10.
- 5 22. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 20 vektprosent
koenzym Q10.
- 10 23. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 30 % av
tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-
VPE analyse.
24. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 50 % av
tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-
VPE analyse.
- 15 25. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 60 % av
tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-
VPE analyse.
- 20 26. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 75 % av
tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-
VPE analyse.
- 25 27. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 90 % av
tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller Annexin-
VPE analyse.
- 30 28. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat induserer apoptose i minst rundt 99,9 %
av tumorcellene, målt ved mitokondrial membranfargestoffanalyse og/eller An-
nixin-VPE analyse.

29. Fremgangsmåte for å inhibere angiogenese i en tumor, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at den omfatter å bringe en tumor i kontakt
med et farmasøytisk preparat omfattende koenzym Q10.
- 5 30. Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 25 vektprosent
koenzym Q10.
31. Fremgangsmåte ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det farmasøytiske preparat omfatter rundt 1 til rundt 20 vektprosent
koenzym Q10.
- 10 32. Sett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter koenzym
Q10, fosfolipon 90, glyserol, butylert hydroksytoluen (BHT), etanol, middelkjede-
de triglycerider (MCT), og lavendel.
33. Sett ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfoli-
pon 90 er fosfolipon 90G.
- 15 34. Sett ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfoli-
pon 90 er fosfolipon 90H.
35. Sett ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfoli-
pon 90 er fosfolipon 90G og fosfolipon 90H.
- 20 36. Sett ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at koen-
zym Q10 er tilveiebrakt i mengde av mellom rundt 1 og 30 vektprosent.

In vitro-studium av SK MEL celler i
medium inneholdende koenzym
Q10 etter 48 timers inkubering

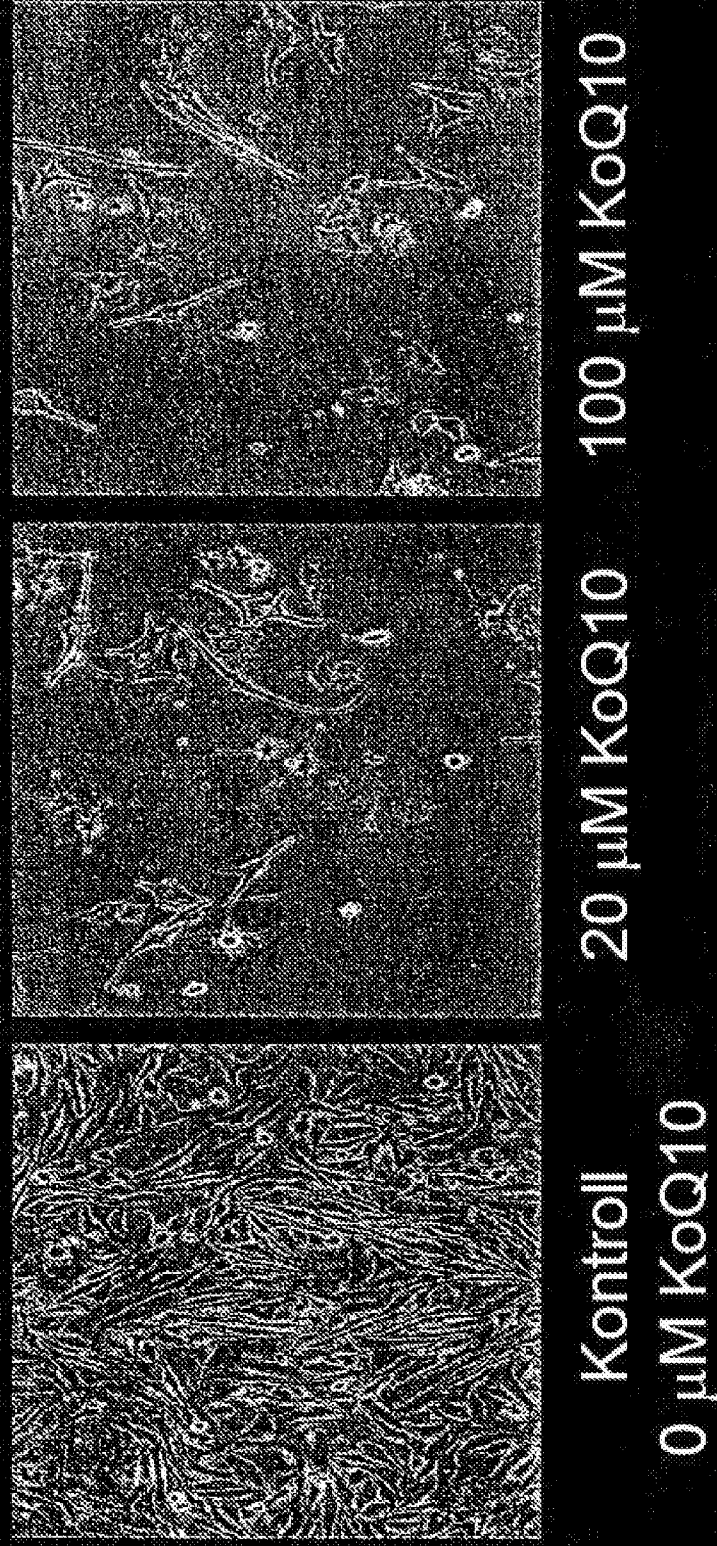
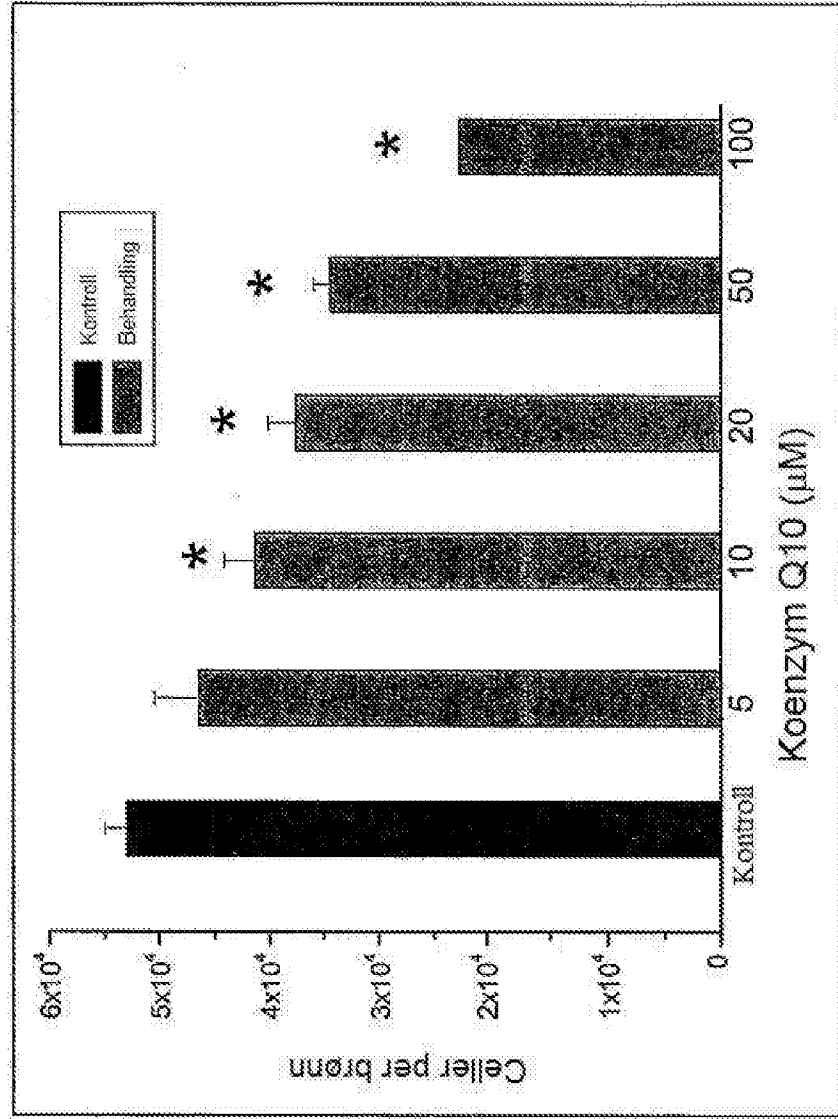


Fig. 1

Effekten av koenzym Q10 på humanmelanomcellelinje SKMEL28

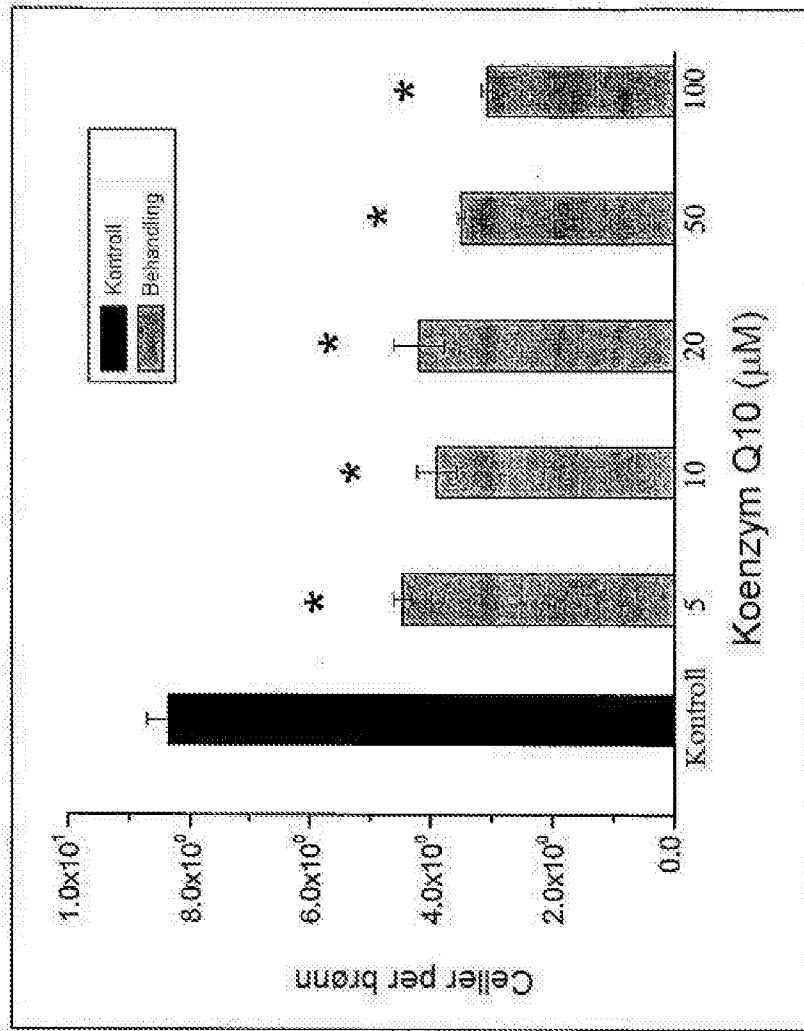


Etter 36 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 2

Effekten av koenzym Q10 på humanmelanomcellelinje SKMEL28

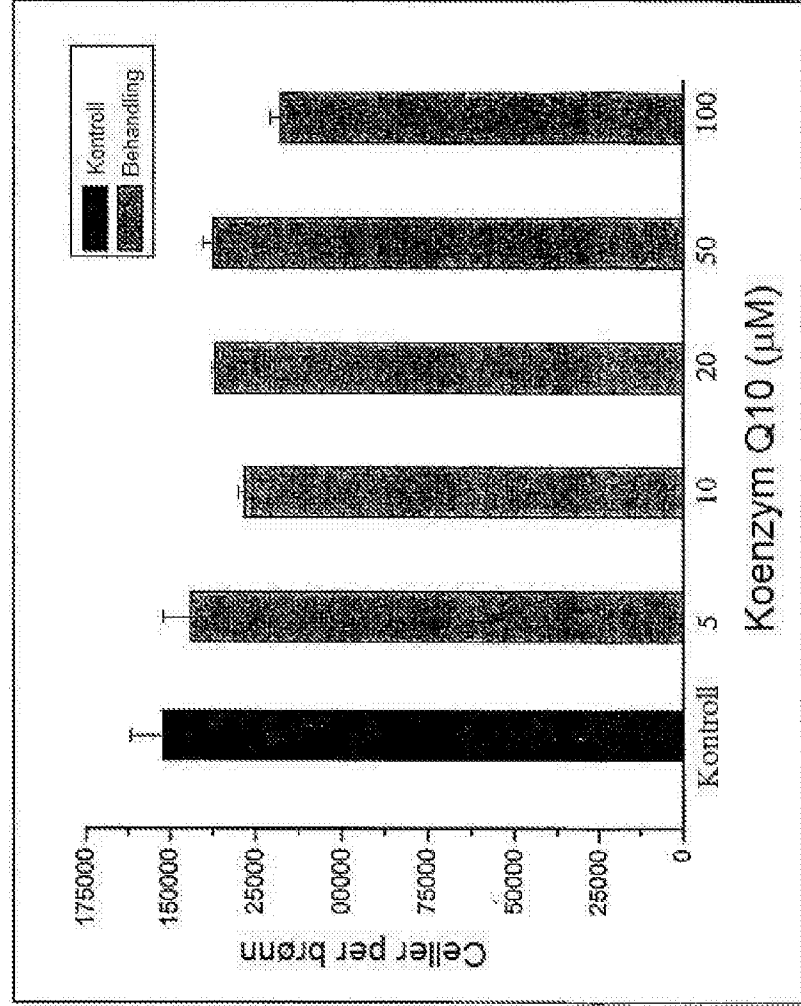


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0,05$

Fig. 3

Effekten av koenzym Q10 på humanmelanomcellelinje SKMEL28

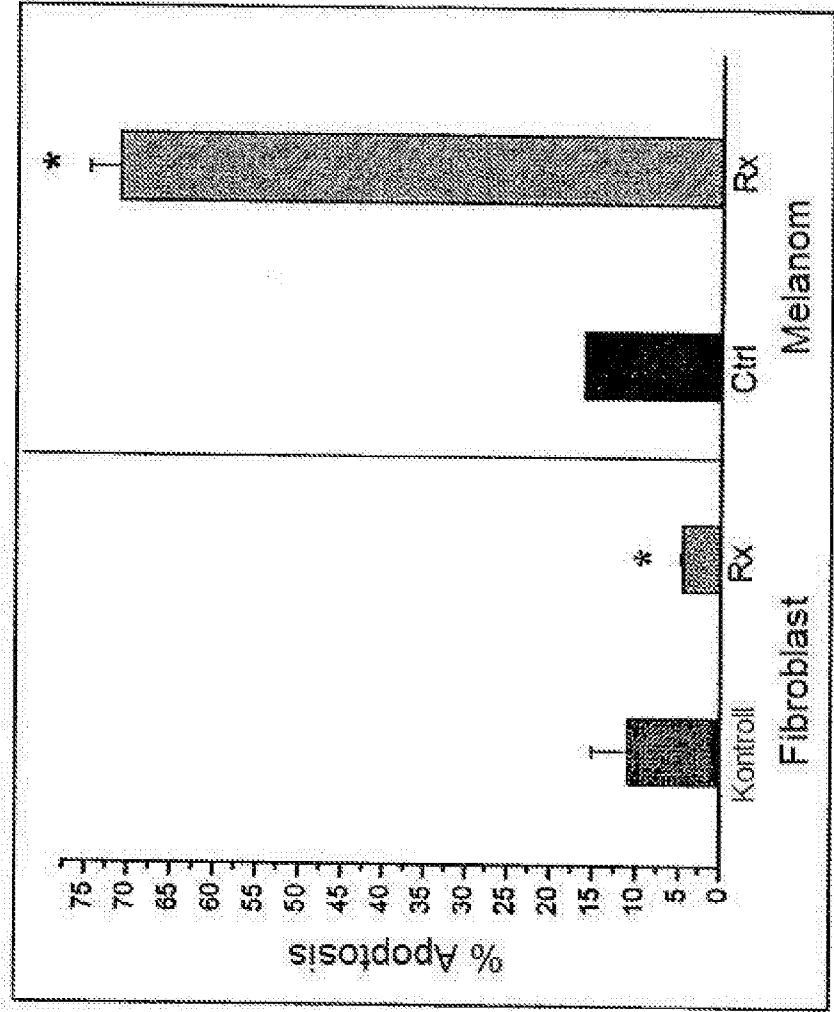


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 4

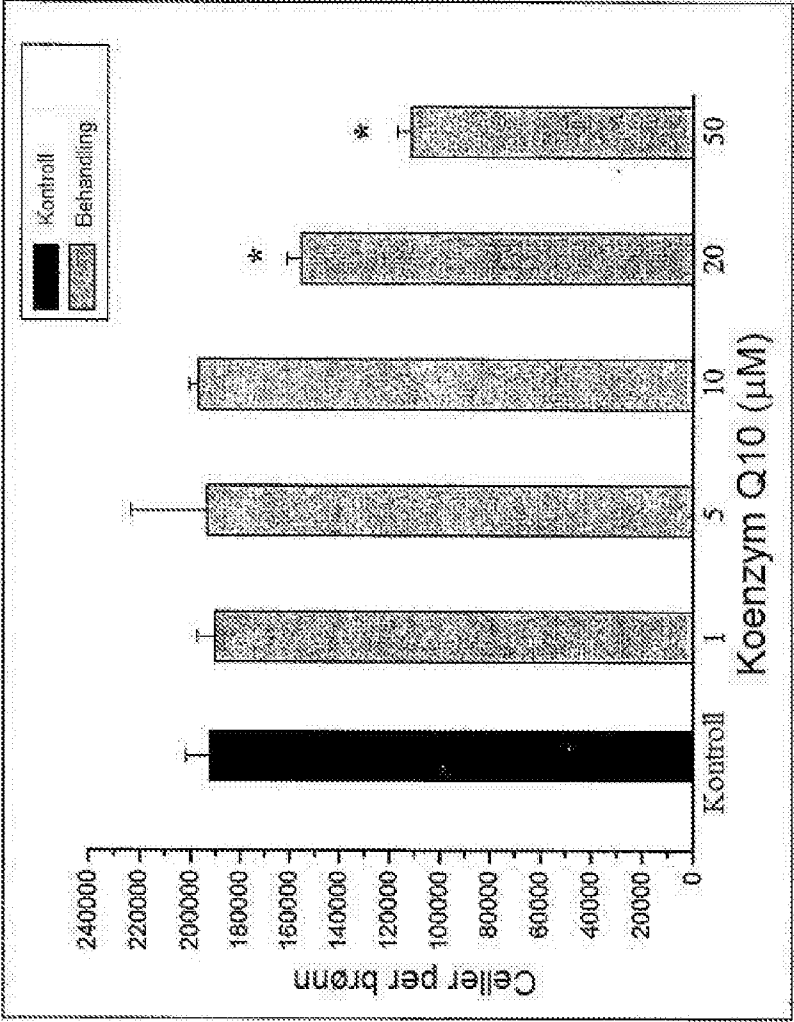
Effekt av koenzym Q10 på apoptose i human melanom- og fibroblastceller- Annexin PE analyse



*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 5

Effekten av koenzym Q10 på skvamøse karsinomceller

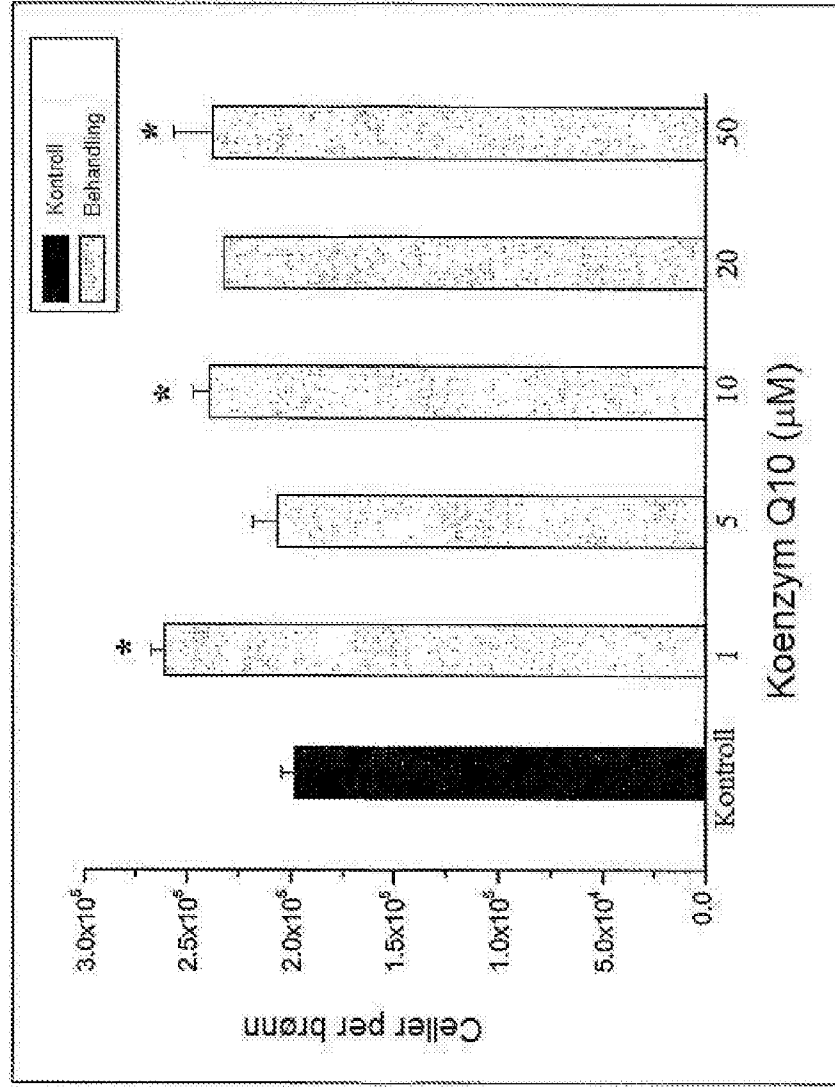


Etter 48 timers inkubering

**Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0,05$*

Fig. 6

Effekten av koenzym Q10 på human neonatalfibroblast

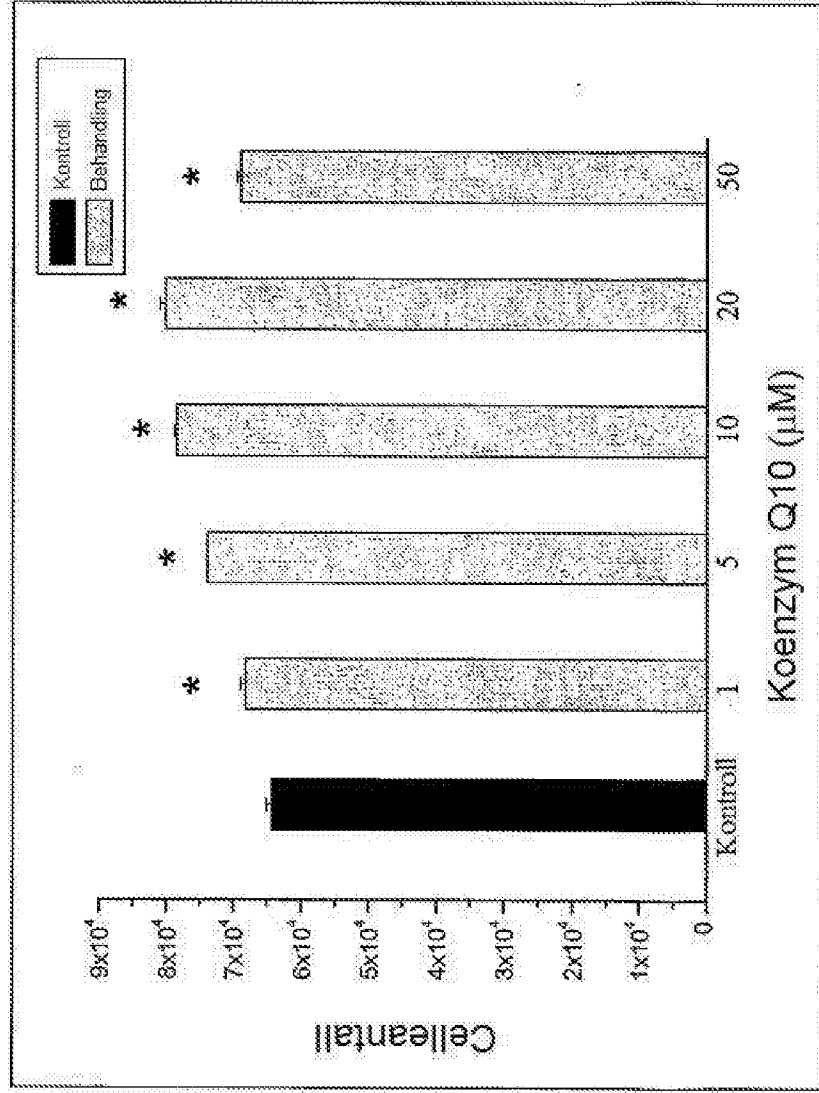


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0.05$

Fig. 7

Effekten av koenzym Q10 på human neonatale keratinocytter

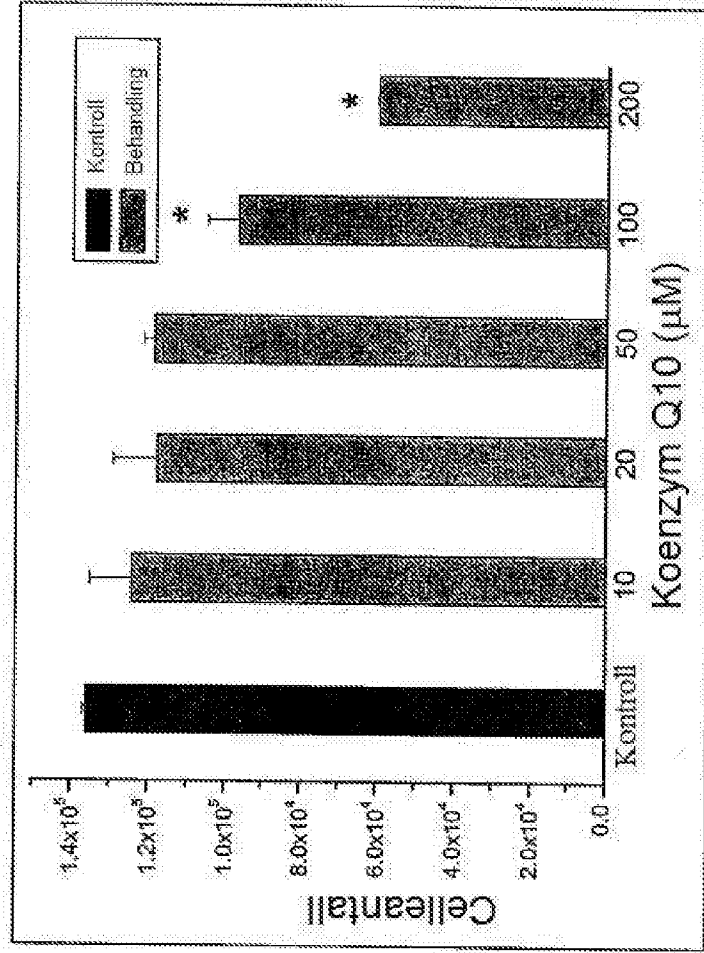


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0.05$

Fig. 8

Effekten av Rx-effekten av koenzym Q10 på human brystadenokarsinom-MCF-7-cellelinje

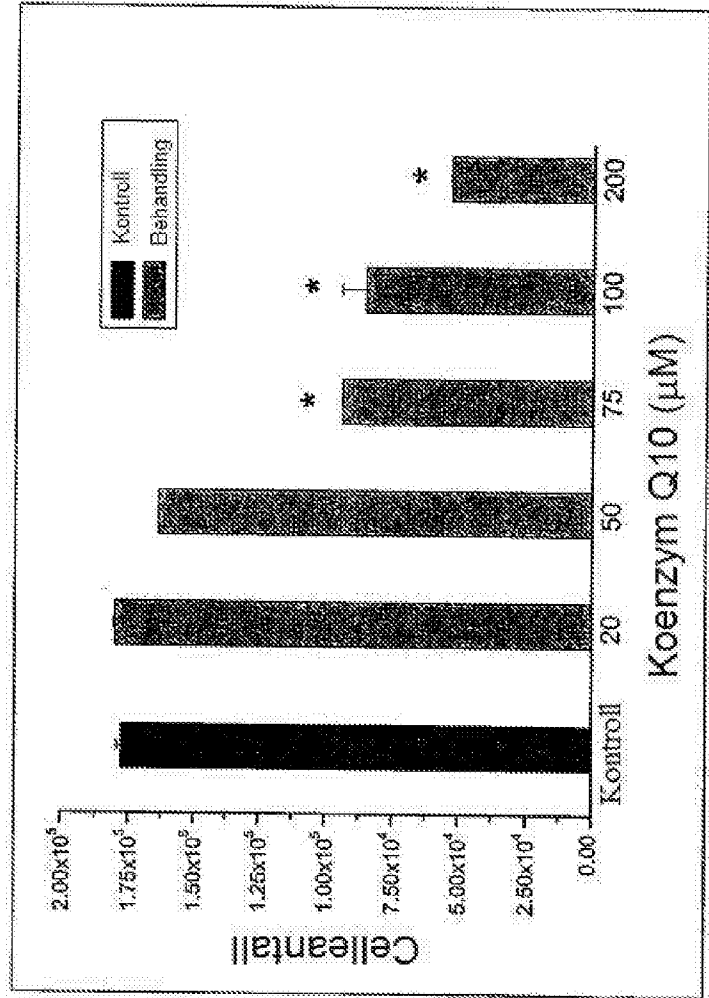


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0.05$

Fig. 9

Effekten av Rx-effekten av koenzym Q10 på human brystadenokarsinom-MCF-7-cellelinje



Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0,05$

Fig. 10

Opptreden av tumorer på behandlingsmus versus kontrollmus



Fig. 11

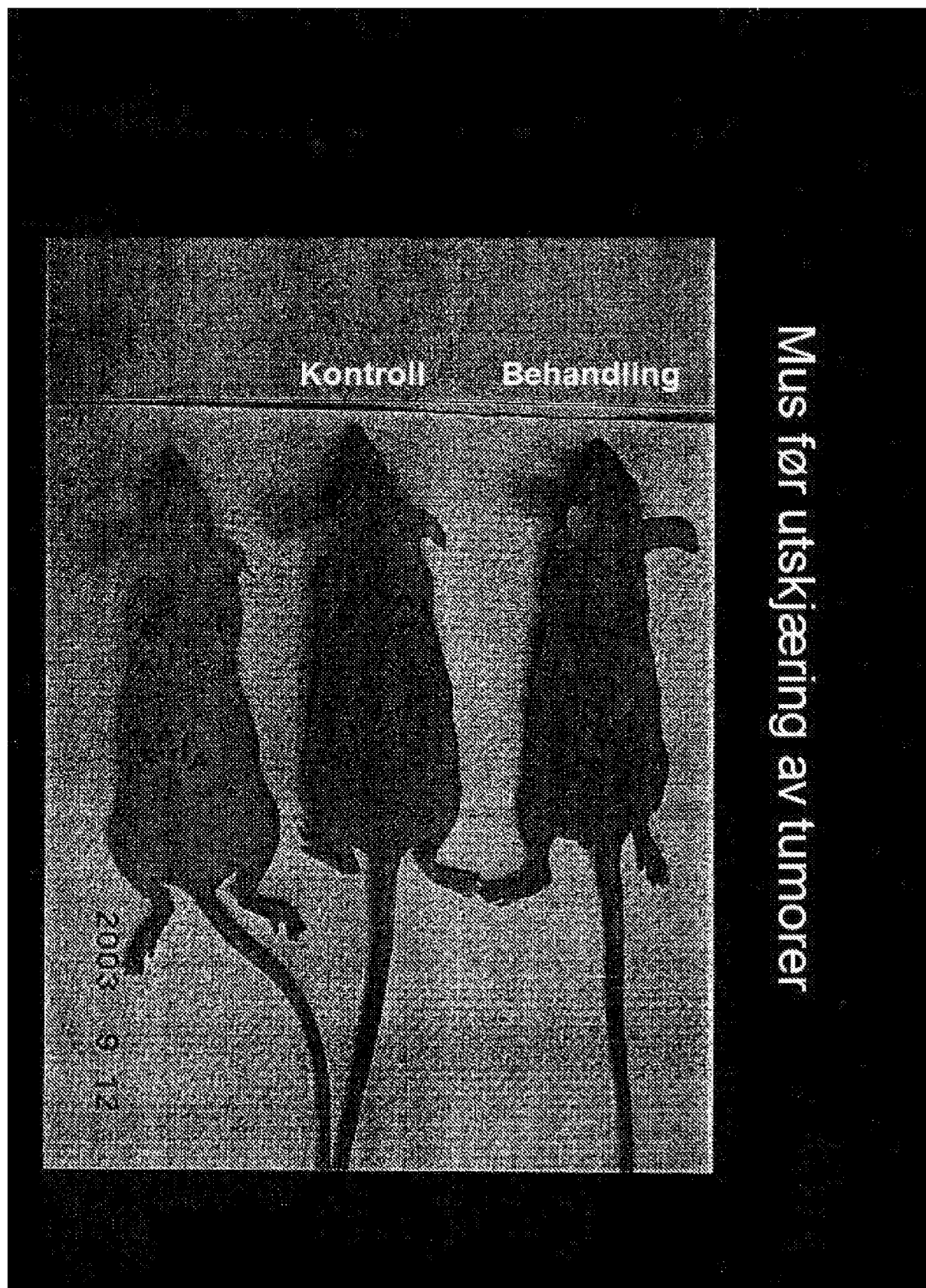


Fig. 12

SKMEL tumorer etter 30 dagers behandling med koenzym Q10

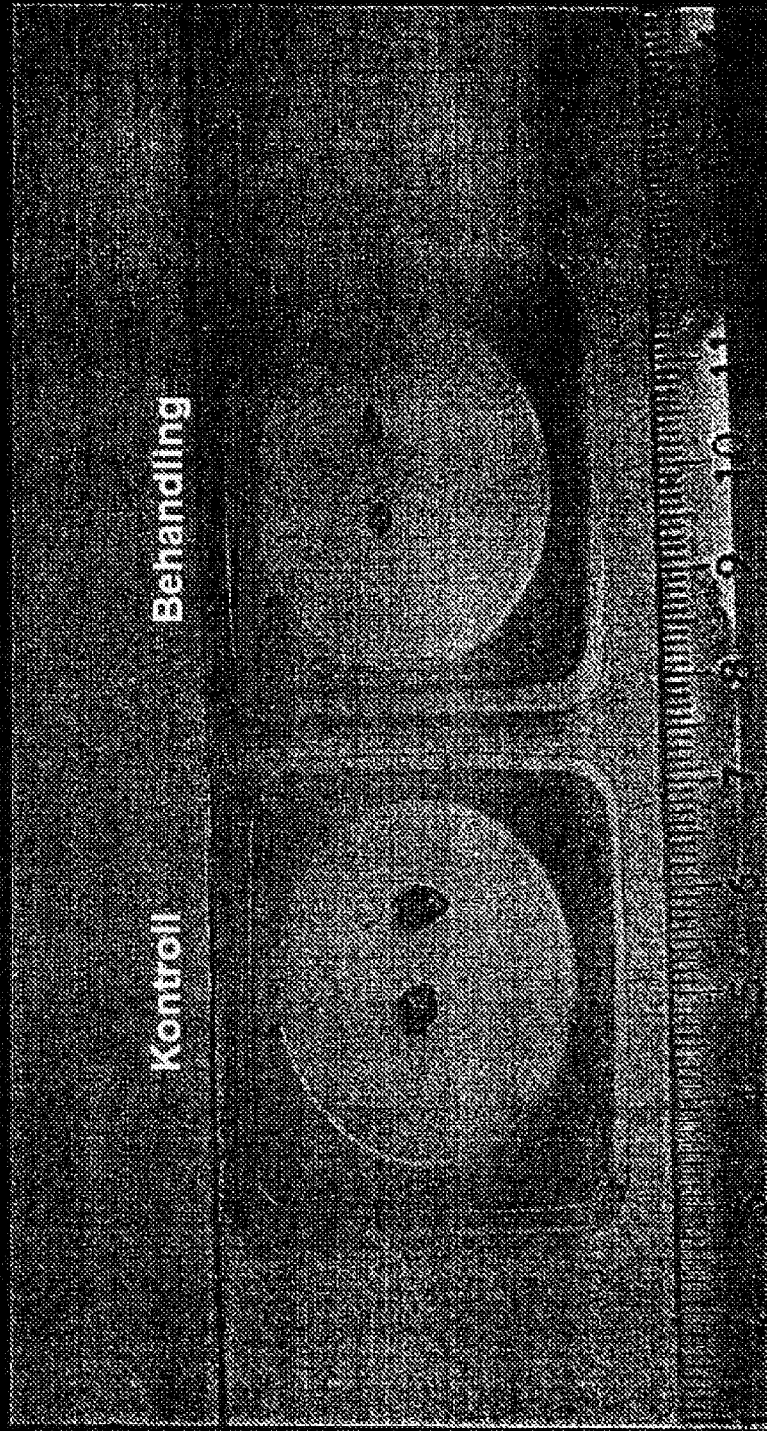
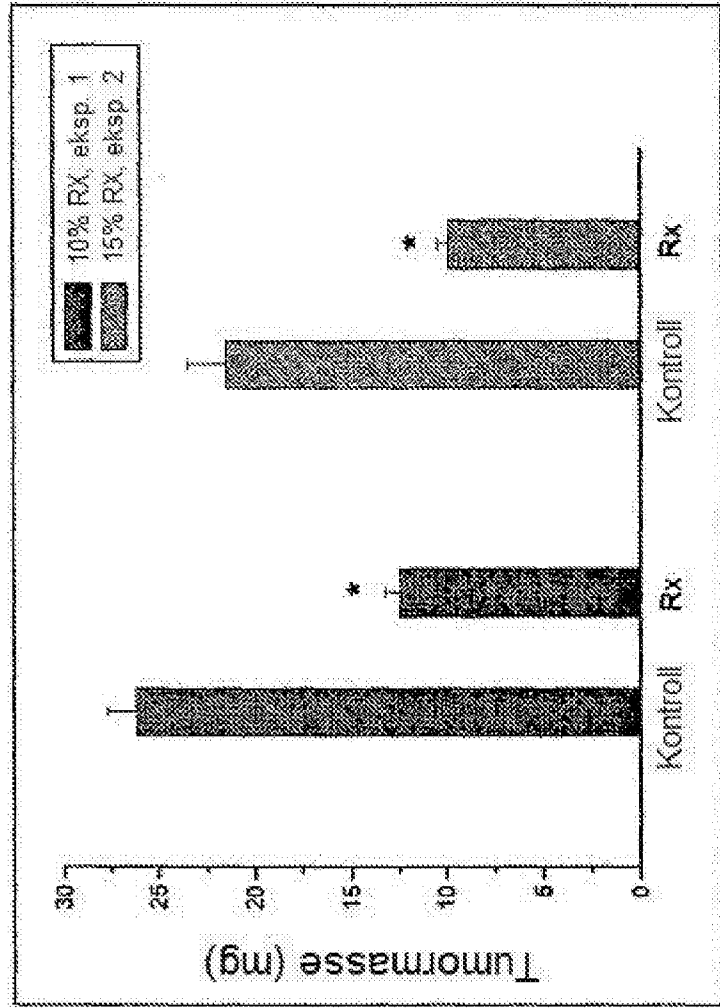


Fig. 13

Effekt av topisk KoQ10 på SKMEL28 tumormasse i nakne mus



*Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0.05$

Fig. 14

In vitro-studie av humanbrystadenokarsinomcellelinje
SK-BR-3 inkubert i medium supplert med koenzym
Q10 for en 72 timers periode

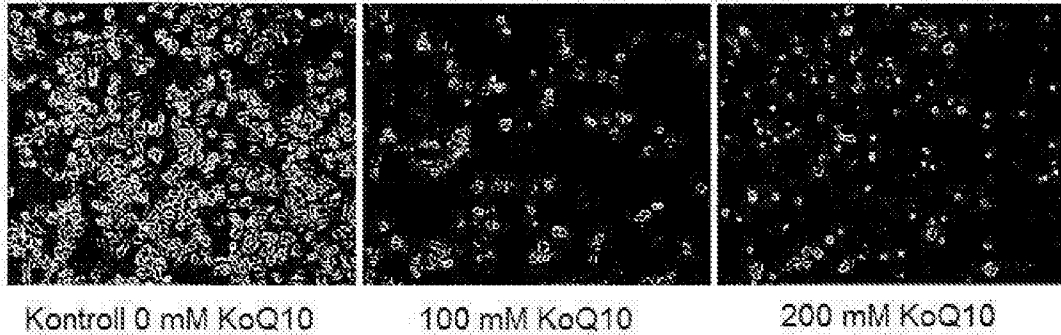
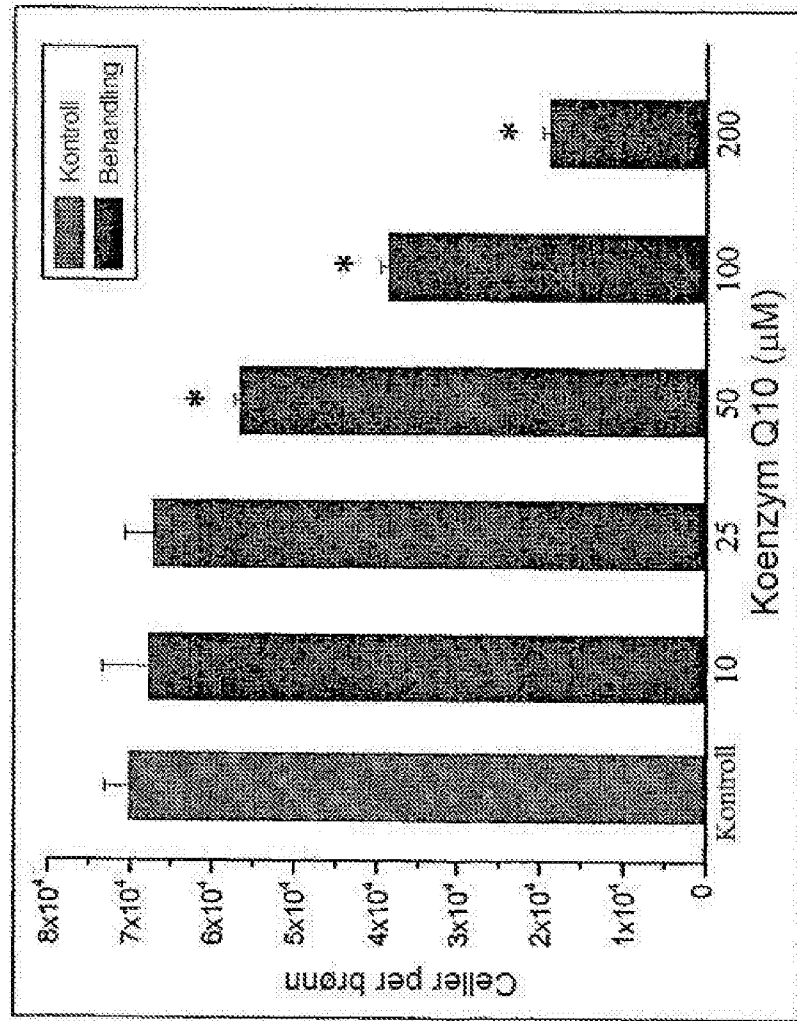


Fig. 15

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer-SK- BR-3-cellelinje

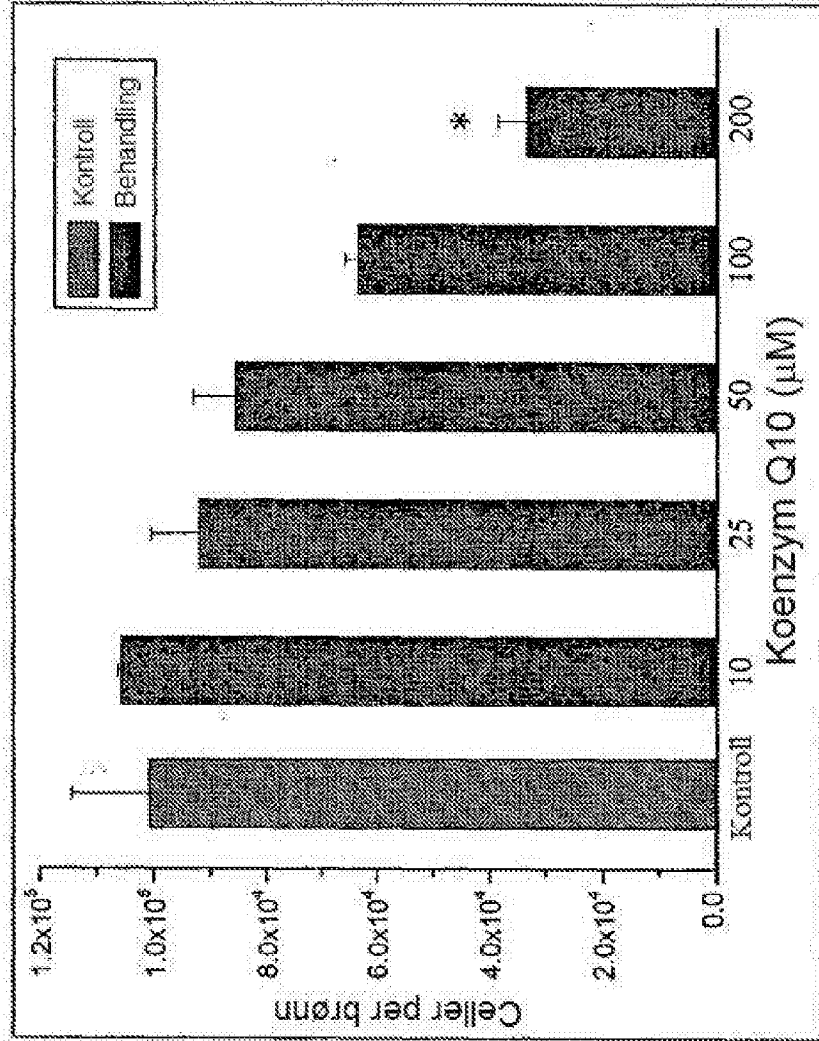


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,0$

Fig. 16

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer-SK-BR-3-cellelinje

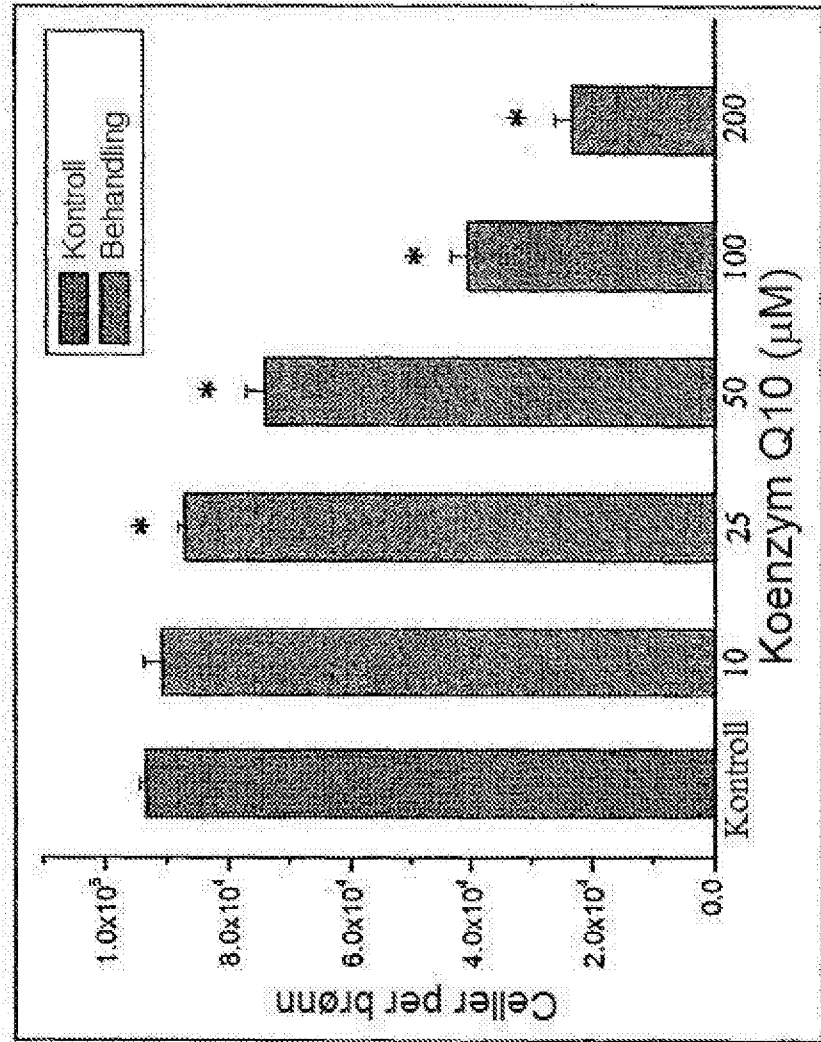


Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0,05$

Fig. 17

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer- MDA-MB-468-cellelinje

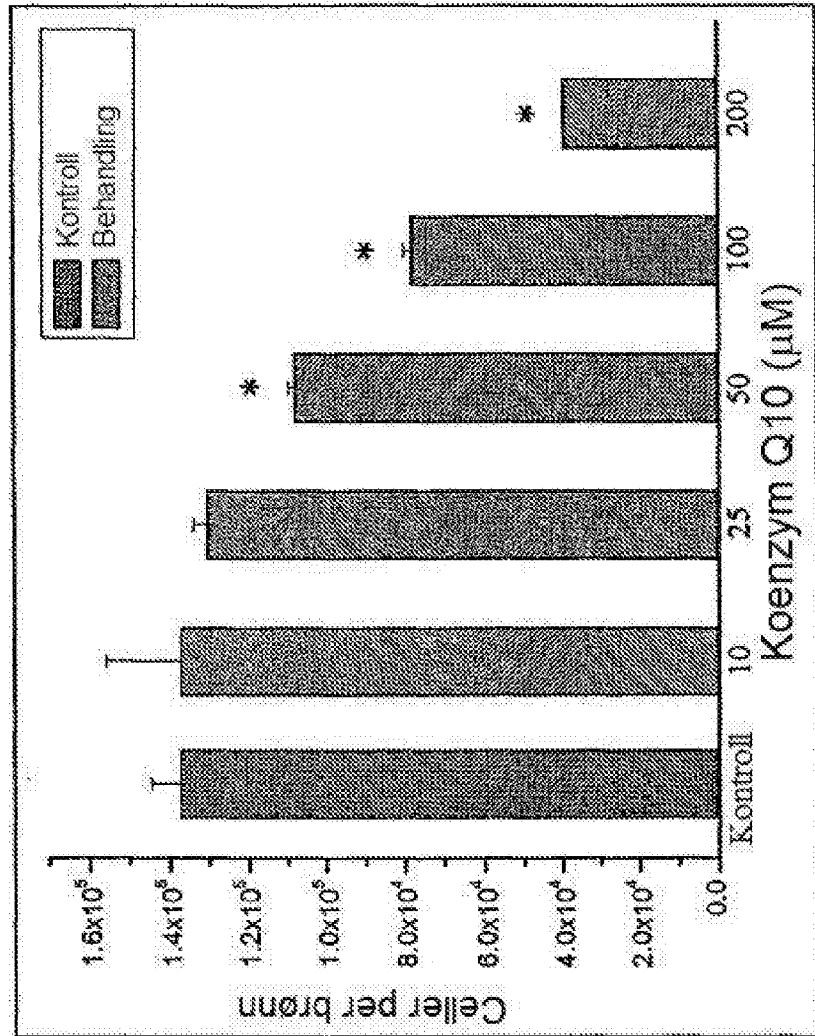


Etter 48 timers inkubering

**Signifikant sammenliknet med kontroll P<0,05*

Fig. 18

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer- MDA-MB-468-cellelinje

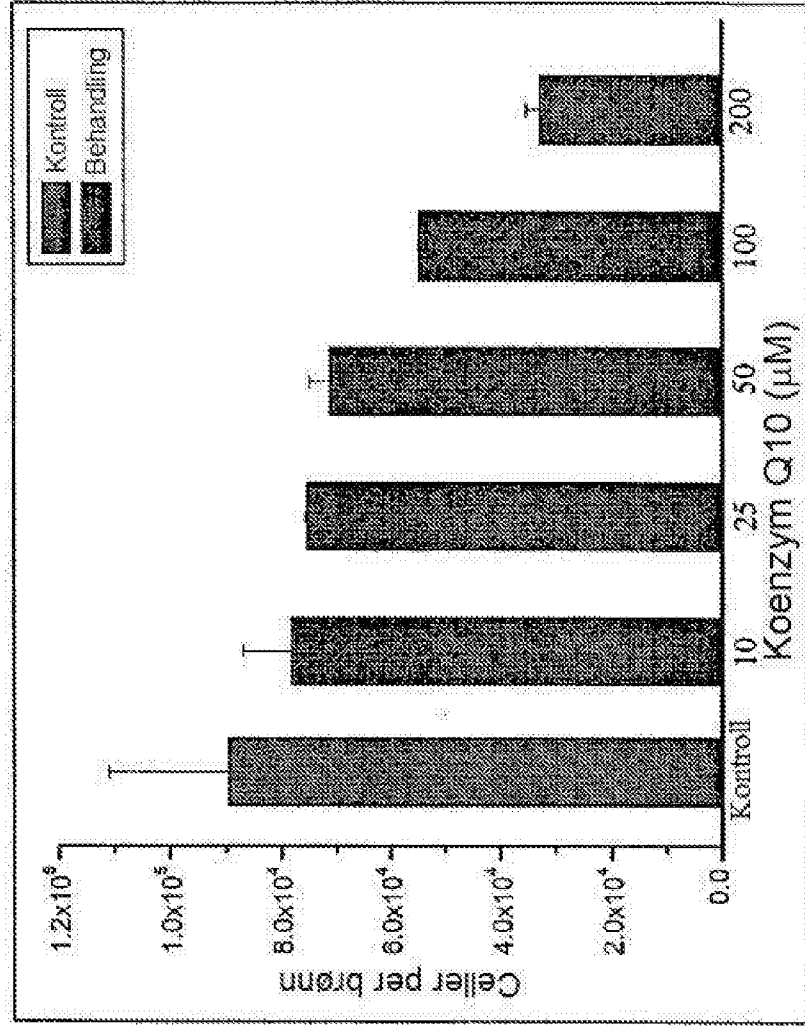


Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P<0,05$

Fig. 19

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer- BT-20-cellelinje

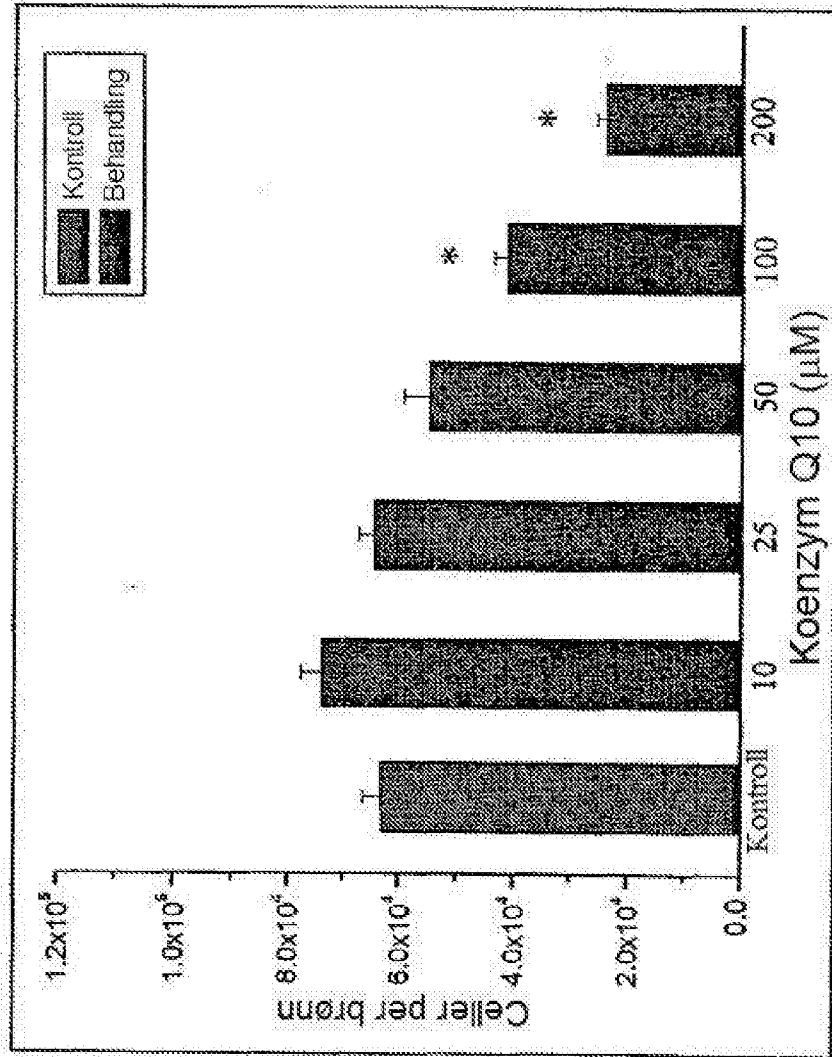


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0.05$

Fig. 20

Effekt av koenzym Q10 på brystcancer- BT-20-cellelinje

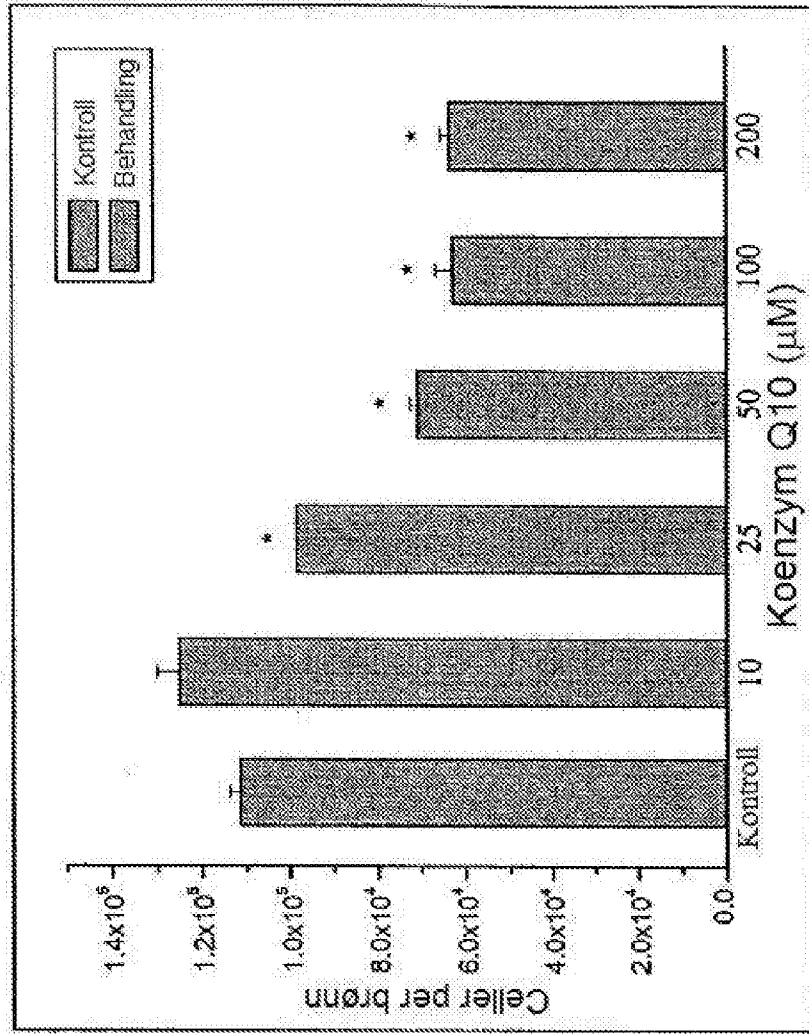


Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 21

Effekt av koenzym Q10 på levercancer Hep 3B celledinje

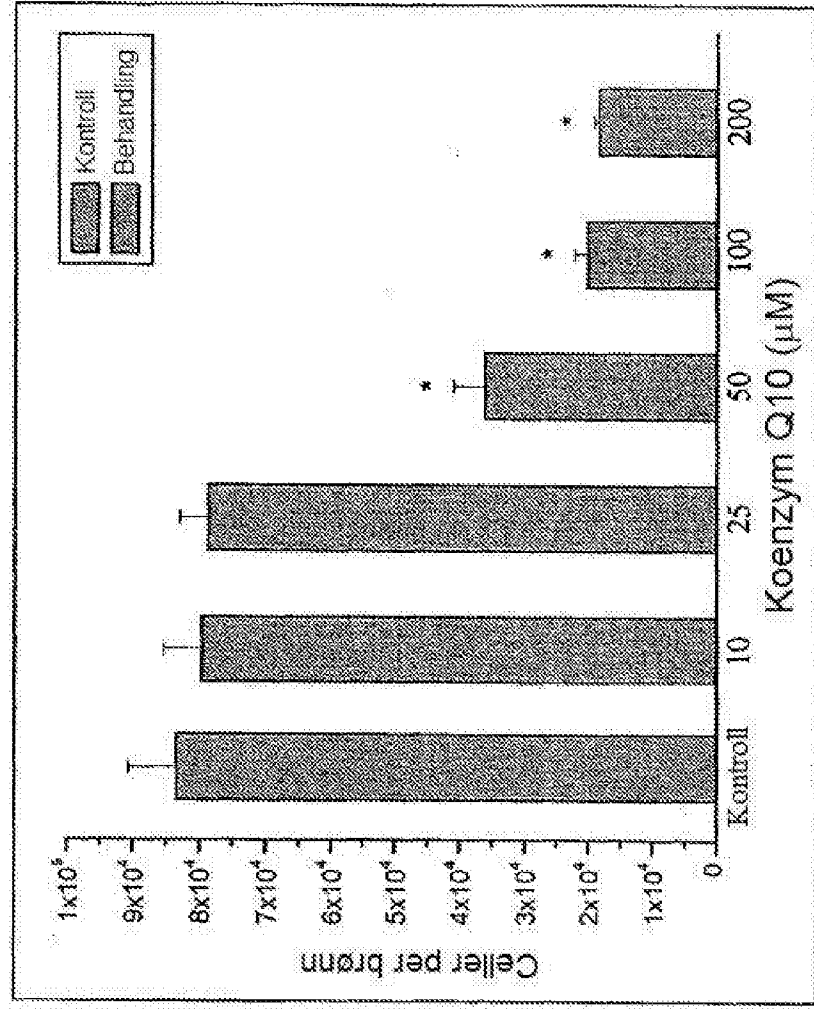


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 22

Effekt av koenzym Q10 på levercancer Hep 3B celledinje

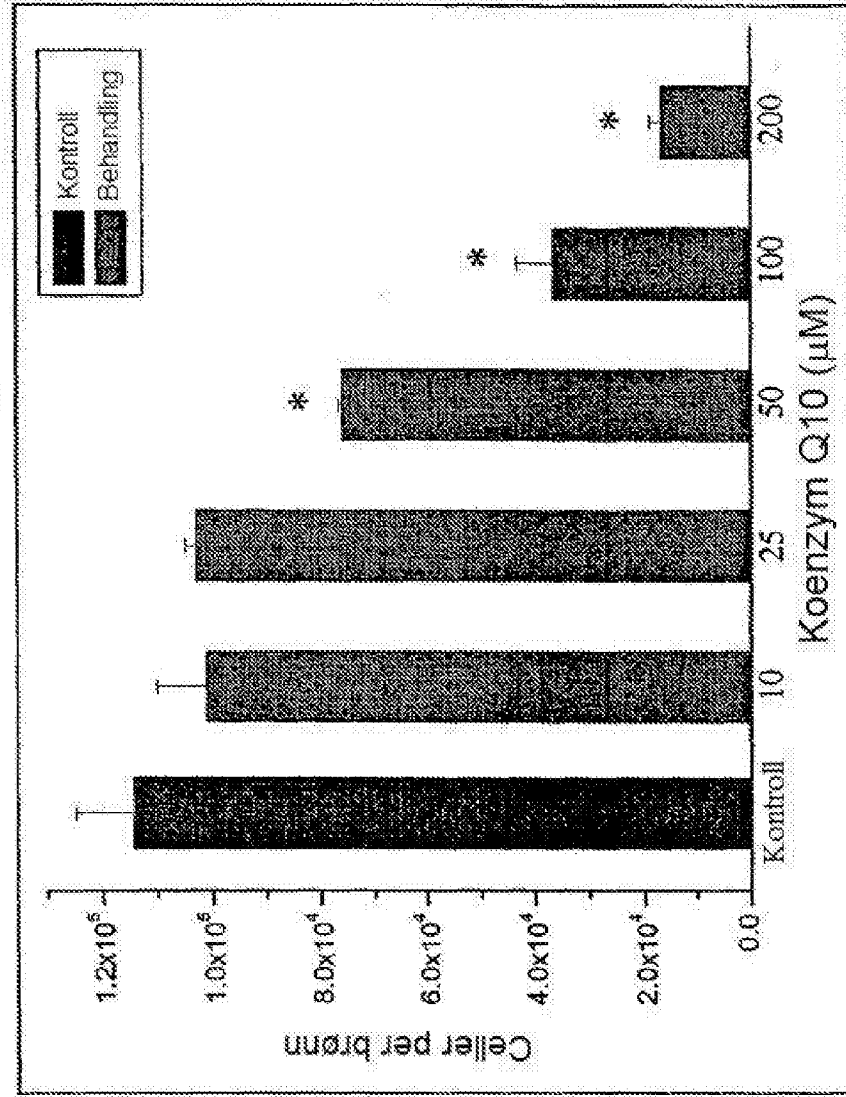


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0.05$

Fig. 23

Effekten av koenzym Q10 på osteosarkom 143B cellelinje

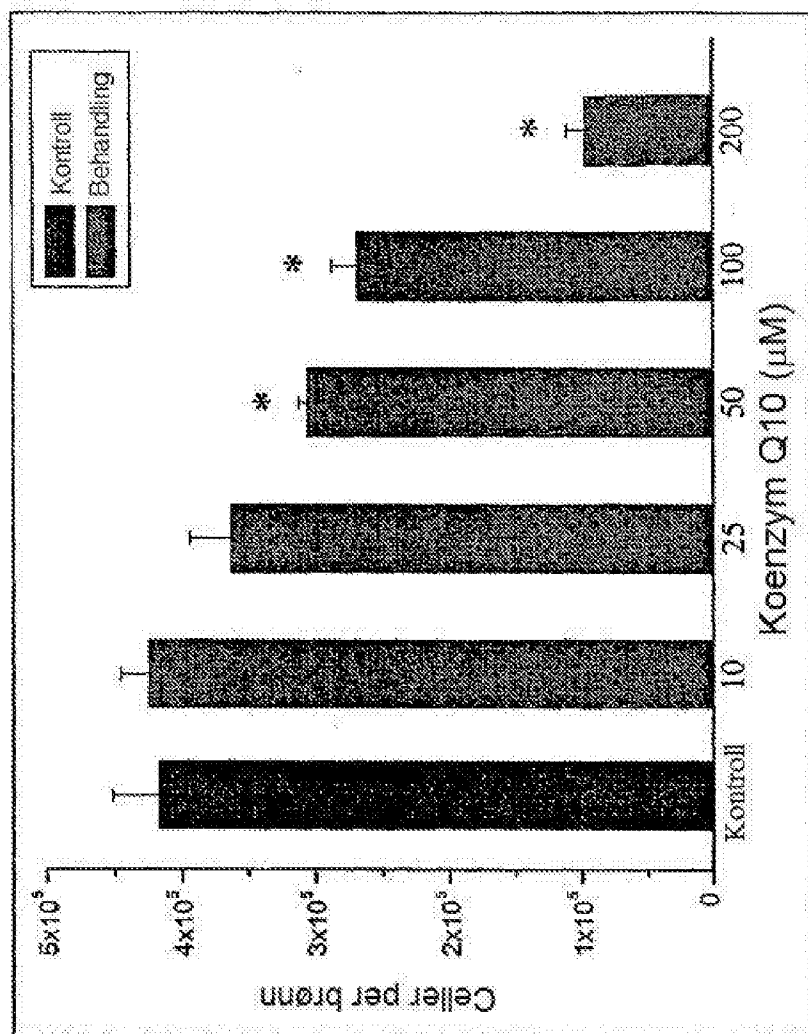


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 24

Effekten av koenzym Q10 på osteosarkom 143B celledlinje

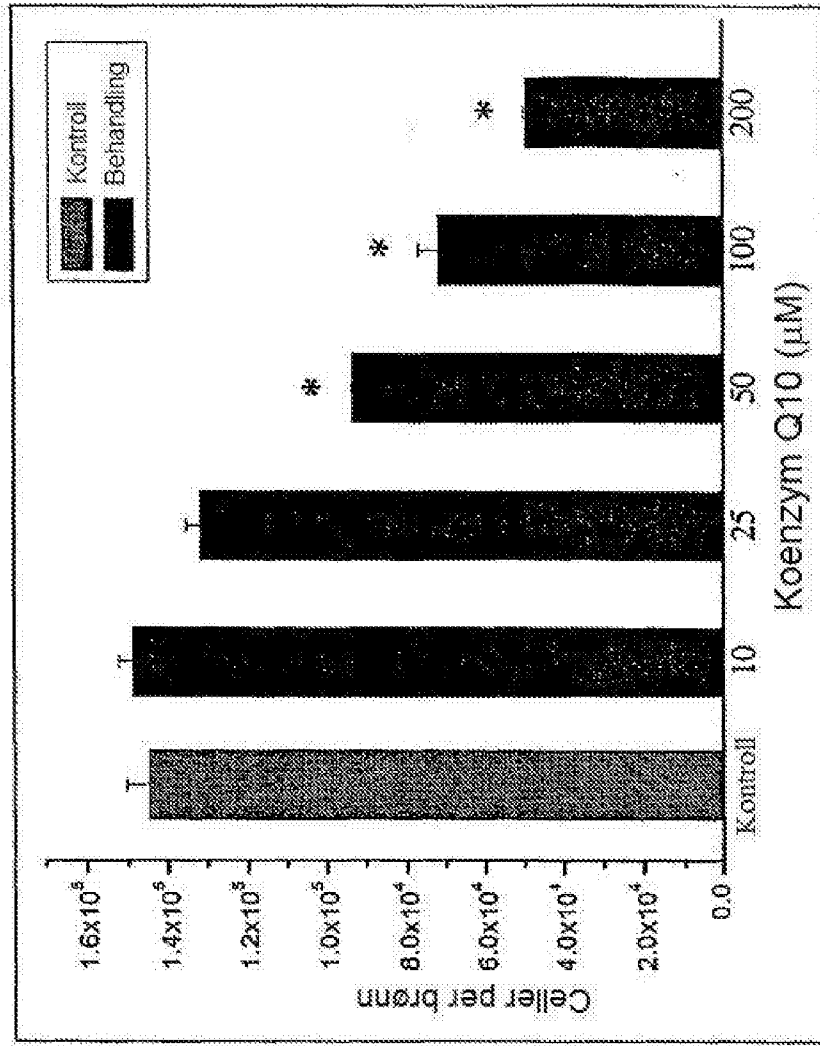


Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 25

Effekten av koenzym Q10 på prostata PC-3 cancercellelinje

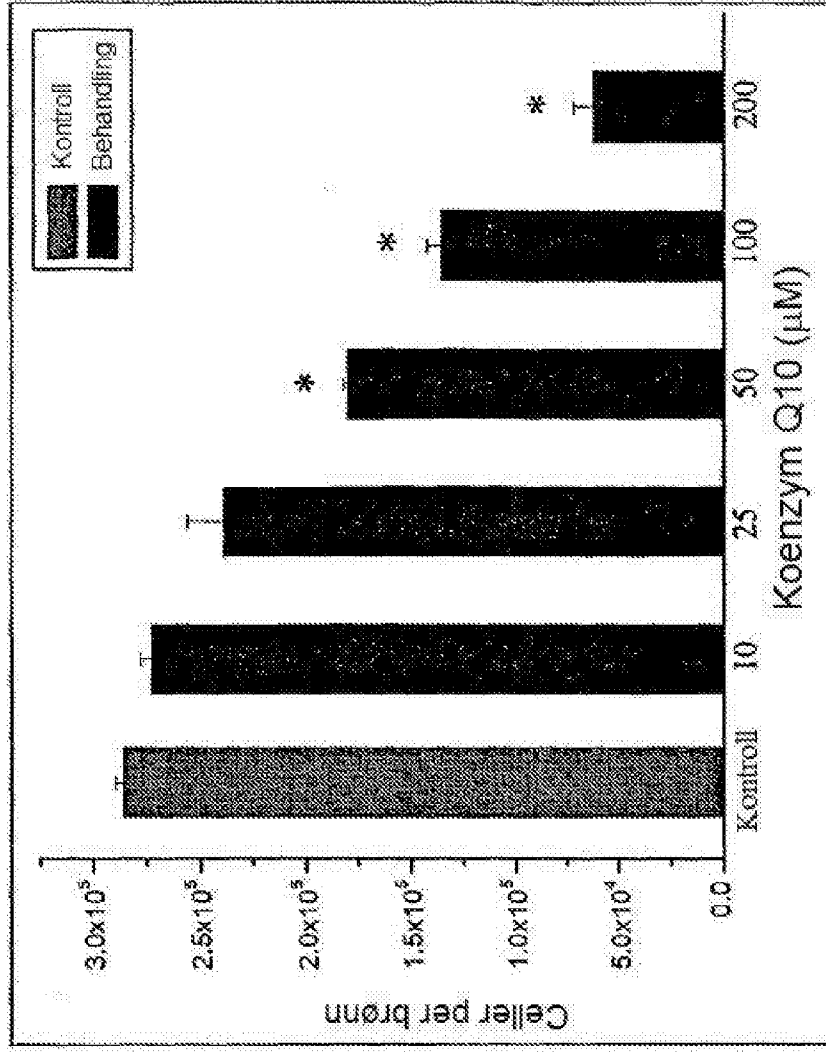


Etter 48 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 26

Effekten av koenzym Q10 på prostata PC-3 cancercellelinje

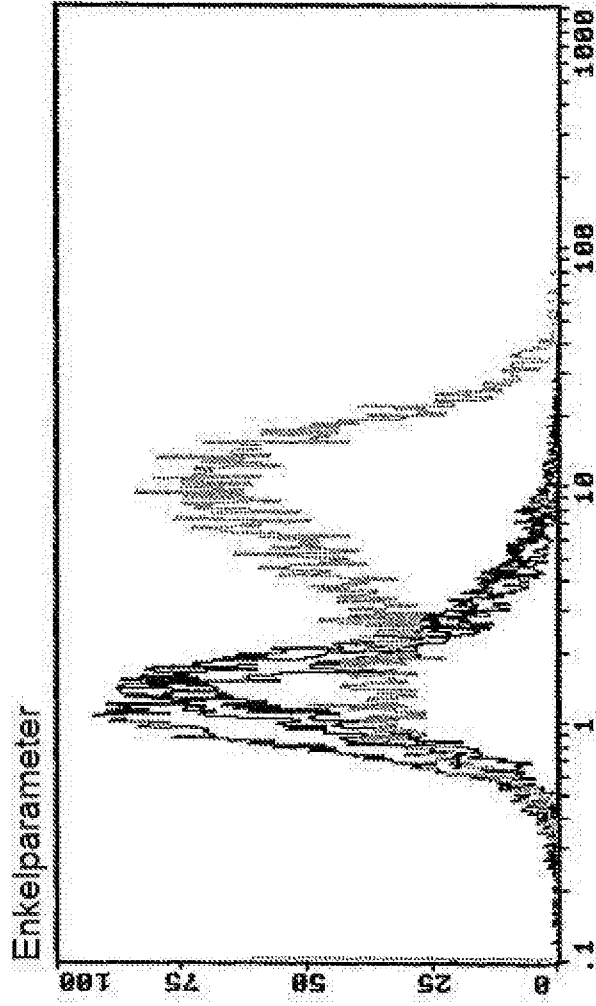


Etter 72 timers inkubering

*Signifikant sammenliknet med kontroll $P < 0,05$

Fig. 27

Q10- og mitokondrial permeabilitet i PC-3 celler: JC-1 opptak



Logg grønn fluorescens

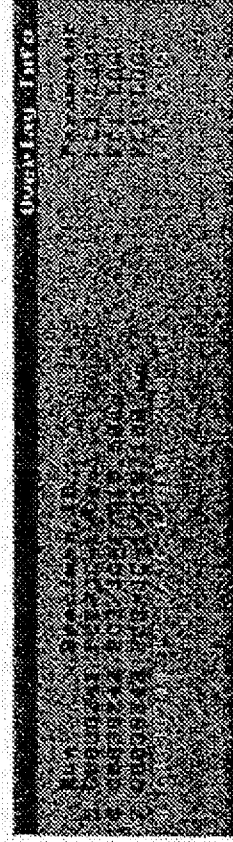


Fig. 28



Fig. 29a

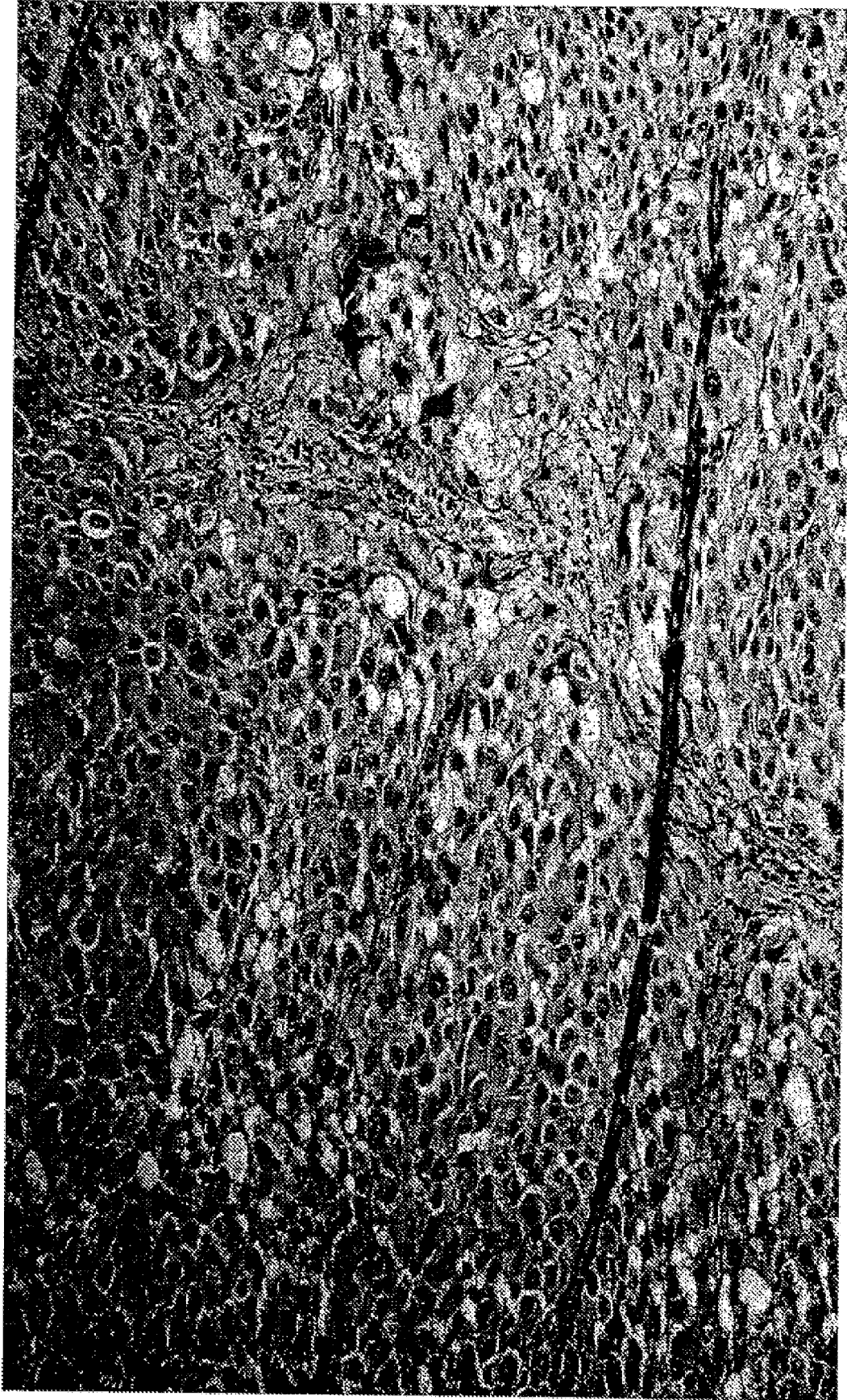


Fig. 29b