



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0056816  
(43) 공개일자 2018년05월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/00* (2006.01) *A61K 31/122* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 31/00* (2013.01)  
*A61K 31/122* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7014434(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년05월11일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2011-7029583  
원출원일자(국제) 2010년05월11일  
심사청구일자 2015년05월08일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/034453
- (87) 국제공개번호 WO 2010/132507  
국제공개일자 2010년11월18일
- (30) 우선권주장  
61/177,243 2009년05월11일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
**베르그 엘엘씨**  
미국 테네시주 37210 네쉬빌 엘름 힐 피크 1845
- (72) 발명자  
**나라인 니벤 라진**  
미국 매사추세츠주 02142 캠브리지 스위트 2005  
씨드 스트리트 350  
**맥쿱 존 패트릭**  
미국 텍사스주 75034 프리스코 서던 힐즈 드라이  
브 4913
- (74) 대리인  
**장훈**

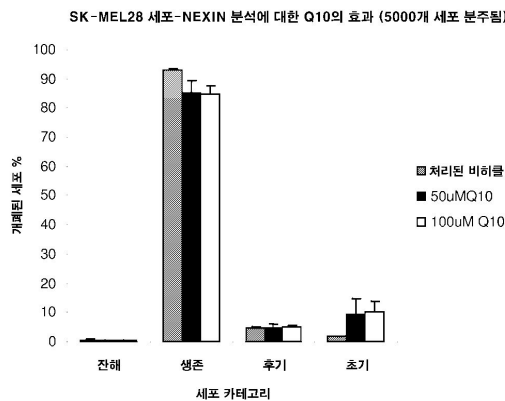
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 **환경대사적 전환인자(조효소 Q10)를 사용한 질환의 치료 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 환경대사적 전환인자(조효소 Q10)를 사용한 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 조효소 Q10을 사용한 사람에서 종양학적 장애를 치료하기 위한 제형이 기재되어 있다.

**대표도**



(52) CPC특허분류  
A61K 2121/00 (2013.01)

(30) 우선권주장  
61/177,245 2009년05월11일 미국(US)  
61/177,241 2009년05월11일 미국(US)  
61/177,244 2009년05월11일 미국(US)  
61/177,246 2009년05월11일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조효소 Q10(CoQ10)을 치료되거나 예방되도록 사람에게 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, CoQ10이 종양학적 장애의 암 세포에서 아포토시스 또는 세포 사멸 기작을 유도하는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, CoQ10이 종양학적 장애의 암 세포에서 혈관형성을 억제하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, CoQ10이 종양학적 장애의 암 세포에서 미세환경내 면역관련 요소의 조절을 유도하는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, CoQ10이 종양학적 장애의 암 세포에서 세포 주기 조절에 변화를 유도하는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 국소 투여가 치료되는 장애에 대한, 사람에서의 효능을 제공하기 위해 선택된 용량을 통해 수행되는 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제6항에 있어서, 장애의 치료 또는 예방이 조효소 Q10의 산화된 형태에 의해 수행되는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 집단이 치료되고 집단의 25% 이상이 조직 병리학, 임상적 관찰, 사진촬영 분석, CT-스캔, MRI 영상화, 암의 혈액, 혈청 또는 혈장 마커를 포함하는 당업계에 공지된 종점에 의한 측정시 증상의 감소를 경험하는 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 사람 집단이 치료되고 집단의 25% 이상이 치료되는 장애에 대해 치료학적인 전신성 조효소 Q10 수준을 갖는 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 치료되는 종양학적 장애가 치료학적 유효 수준으로 활성제의 전신성 전달이 예상되는 국소 투여를 통해 국소적으로 치료되는 장애가 아닌 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 치료되는 사람 조직에서 조효소 Q10의 농도가 건강하거나 정상 상태를 나타내는 사람 조직의 조절 표준 농도와는 상이한 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 사람에게 투여된 조효소 Q10의 형태가 사람내 전신 순환계에서 발견되는 주요 형태와는 상이한 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토졸 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스무타제 2, VDAC, 박스(Bax) 채널, ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C, 그리고 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 또는 표 2 내지 4 및 6 내지 28에 열거된 유전자 중 임의의 하나 이상과 조효소 Q10의 상호작용을 통해 수행되는 방법.

**청구항 14**

제6항에 있어서, 조효소 Q10이 피부의 평방 센티미터 당 조효소 Q10의 약 0.01 내지 약 0.5mg 범위의 용량으로 표적 조직에 국소 비히클로 적용되는 방법.

**청구항 15**

제6항에 있어서, 조효소 Q10이 피부의 평방 센티미터 당 조효소 Q10의 약 0.09 내지 약 0.15mg 범위의 용량으로 표적 조직에 국소 비히클로 적용되는 방법.

**청구항 16**

제6항에 있어서, 조효소 Q10이 피부의 평방 센티미터 당 조효소 Q10의 약 0.12mg의 용량으로 표적 조직에 국소 비히클로 적용되는 방법.

**청구항 17**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 종양학적 장애가 편평상피세포 암종인 방법.

**청구항 18**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 종양학적 장애가 기저세포 암종인 방법.

**청구항 19**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 종양학적 장애가 SCC이고 전암성(pre-cancerous) 병변 광선각화증이 SCC로 진행되는 것을 차단하는 방법.

**청구항 20**

제6항에 있어서, 종양학적 장애가 흑색종인 방법.

**청구항 21**

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 조효소 Q10이 6주 이상동안 24시간 마다 1회 이상 국소적으로 적용되는 방법.

**청구항 22**

제6항에 있어서, 조효소 Q10이 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 크림 0.5 내지 10mg의 용량으로 CoQ10 크림 형태로 투여되고 상기 CoQ10 크림이 1 내지 5%의 조효소 Q10을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, CoQ10 크림이 약 3%의 조효소 Q10을 포함하는 방법.

**청구항 24**

제6항에 있어서, 조효소 Q10이 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 크림 3 내지 5mg의 용량으로 CoQ10 크림 형태로 투여되고 상기 CoQ10 크림이 1 내지 5%의 조효소 Q10을 포함하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, CoQ10 크립이 약 3%의 조효소 Q10을 포함하는 방법.

**청구항 26**

공격성 종양학적 장애가 치료되거나 예방되도록, 덜 공격성이거나 비-공격성인 종양학적 장애에 대해 사용되거나 선택된 용량 치료 보다 낮게 선택된 용량으로 조효소 Q10을 사람에게 투여하는 단계를 포함하는, 사람에서 공격성 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 공격성 종양학적 장애가 췌장 암종, 간세포 암종, 어빙 육종(Ewing sarcoma), 전이성 유방암, 전이성 흑색종, 뇌암(성상세포종, 교모세포종), 신경내분비암, 결장암, 폐암, 골육종, 안드로겐 관련없는 췌장암, 난소암 및 비-호지킨 림프종으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 28**

비-공격성 종양학적 장애가 치료되거나 예방되도록, 공격성 종양학적 장애에 대해 사용되거나 선택된 용량 치료 보다 높게 선택된 용량으로 조효소 Q10을 사람에게 투여하는 단계를 포함하는, 사람에서 비-공격성 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 비-공격성 종양학적 장애가 비-전이성 유방암, 안드로겐 의존성 전립선 암, 소세포 폐암 및 급성 림프구 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 30**

종양학적 장애가 치료되도록 조효소 Q10을 사람에게 투여하는 단계를 포함하고, 조효소 Q10이 치료동안에 산화된 형태로 유지되도록 투여되는, 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법.

**청구항 31**

- (1) 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하는 단계,
- (2) 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서 중간체를 상기 사람에게 투여하여, 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 단계를 포함하는, 사람에서 글루코스의 혐기적 사용을 차단시키고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키기 위한 방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서,

- (1) HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토솔 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스무타제 2, VDAC, 박스 채널(Bax channel), ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C 및 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현을 상향조절하고/하거나

- (2) HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토솔 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스무타제 2, VDAC, 박스 채널, ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C 및 Cam 키나제II로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현을 하향조절하여 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시킴을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 33**

- (1) 공격성 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하는 단계,
- (2) 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서의 중간체를 상기 사람에게 투여하여, 글루

코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 단계를 포함하는, 사람에서 글루코스의 혐기적 사용을 차단시키고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키기 위한 방법.

**청구항 34**

제27항에 있어서, 공격성 종양학적 장애가 췌장 암종, 간세포 암종, 어빙 육종(Ewing sarcoma), 전이성 유방암, 전이성 흑색종, 뇌암(성상세포종, 교모세포종), 신경내분비암, 결장암, 폐암, 골육종, 안드로겐 관련없는 췌장암, 난소암 및 비-호지킨 림프종으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 35**

- (1) 비-공격성 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하는 단계,
- (2) 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서의 중간체를 상기 사람에게 투여하여, 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 단계를 포함하는, 사람에서 글루코스의 혐기적 사용을 차단시키고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키기 위한 방법.

**청구항 36**

제29항에 있어서, 비-공격성 종양학적 장애가 비-전이성 유방암, 안드로겐 의존성 전립선 암, 소세포 폐암 및 급성 림프구 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 37**

- 제31항, 제33항 및 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 중간체가,
- (a) 벤조퀴논 또는 벤조퀴논 환의 합성을 촉진시키는 하나 이상의 분자 및
- (b) 이소프레노이드 유닛의 합성 및/또는 이의 벤조퀴논 환으로의 부착을 촉진시키는 하나 이상의 분자를 포함하는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 벤조퀴논 환의 생합성을 촉진시키는 하나 이상의 분자가 L-페닐알라닌, DL-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-티로신, DL-티로신, D-티로신, 4-하이드록시-페닐피루베이트, 3-메톡시-4-하이드록시만델레이트(바닐릴만델레이트 또는 VMA), 바닐릴산, 피리독신, 또는 판테놀을 포함하는 방법.

**청구항 39**

제37항에 있어서, 이소프레노이드 유닛의 합성 및/또는 이의 벤조퀴논 환으로의 부착을 촉진시키는 하나 이상의 분자는: 페닐아세테이트, 4-하이드록시-벤조에이트, 메발론산, 아세틸글리신, 아세틸-CoA, 또는 파르네실을 포함하는 방법.

**청구항 40**

- 제31항, 제33항 및 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 중간체가,
- (a) L-페닐알라닌, L-티로신 및 4-하이드록시페닐피루베이트중 하나 이상 및
- (b) 4-하이드록시 벤조에이트, 페닐아세테이트 및 벤조퀴논중 하나 이상을 포함하는 방법.

**청구항 41**

- 제31항, 제33항 및 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 중간체가,
- (a) Bcl-2 발현을 억제하고/하거나 카스파제-3 발현을 촉진시키고/시키거나,
- (b) 세포 증식을 억제하는 방법.

**청구항 42**

사람의 세포막의 침투성이 조절되고 치료가 수행되도록 하는 용량 계획으로 조효소 Q10을 이를 필요로 하는 사

람에게 투여하는 단계를 포함하는, 사람에서 종양학적 장애를 치료하기 위한 방법.

**청구항 43**

제26항, 제28항, 제30항, 제31항, 제33항 및 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가, HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토졸 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 2, VDAC, 박스 채널(Bax channel), ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C 및 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 및 표 2 내지 4 및 6 내지 28에 열거된 임의의 하나 이상의 유전자와 CoQ10의 상호작용을 통해 수행되는 방법.

**청구항 44**

제1항, 제26항, 제28항, 제30항, 제31항, 제33항 및 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 종양학적 장애가 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종 및 육종으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 45**

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 수술, 방사선, 호르몬 치료, 항체 치료, 성장인자 사이토킨을 사용한 치료 및 화학치료로 구성된 군으로부터 선택된 치료 계획을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 46**

- (1) A상, B상, C상, D상 및 E상을 제조하는 단계; 및
- (2) 3% CoQ10 크림의 수중유 에멀전이 형성되도록 A상, B상, C상, D상 및 E상을 조합하는 단계를 포함하는, 조효소 Q10 크림 3%를 제조하는 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서,

- (1) A상 성분은 4.00%w/w의 알킬 C<sub>12-15</sub> 벤조에이트 NF, 2.00%w/w의 세틸 알콜 NF, 4.5%w/w의 글리세릴 스테아레이트, PEG-100 및 1.50%w/w의 스테아릴 알콜 NF를 포함하고;
- (2) B상 성분은 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP, 그리고 40.00%w/w의 카보머 분산액 2.0%를 포함하고;
- (3) C상 성분은 0.50%w/w의 락트산 USP, 2.00%w/w의 나트륨 락테이트 용액 USP, 1.30%w/w의 트롤아민 NF 및 2.50%w/w의 정제수를 포함하고;
- (4) D상 성분은 1.00%w/w의 이산화티탄 USP을 포함하고;
- (5) E상 성분은 15%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 포함하고,

이때, 중량%가 전체 CoQ10 크림 3%에 상대적인 방법.

**청구항 48**

제46항에 있어서,

- (1) A상 성분이 4.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.00%w/w의 세틸 알콜 NF, 4.5%의 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 및 1.5%w/w의 스테아릴 알콜을 포함하고;
- (2) B상 성분이 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP 및 40.00%w/w의 카보머 분산액 2%를 포함하고;
- (3) C상 성분이 0.50%w/w의 락트산 USP, 2.00%w/w의 나트륨 락테이트 용액 USP, 1.30%w/w의 트리에탄올아민 NF 및 2.50%w/w의 정제수 USP를 포함하고;

- (4) D상 성분은 1.00%w/w의 이산화티탄 USP를 포함하고;
  - (5) E상 성분이 15%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 포함하고;
- 이때, 각 성분의 중량%가 전체 CoQ10 크림 3%에 상대적인, 방법

**청구항 49**

제47항 또는 제48항에 있어서,

- (1) A상 성분을 적합한 용기에 첨가하고 수욕조에서 70 내지 80℃로 가열하는 단계;
- (2) 카보머 분산액을 배제한 B상 성분을 적합한 용기에 첨가하고 혼합하여 혼합 B상을 형성하는 단계;
- (3) C상 성분을 적합한 용기에 위치시키고 이들을 수욕조를 사용하여 70 내지 80℃로 가열하는 단계;
- (4) E상 성분을 적합한 용기에 위치시키고 이들을 수욕조를 사용하여 50 내지 60℃로 가열하는 단계;
- (5) 카보모 분산액을 혼합 탱크에 첨가하고 혼합하면서 70 내지 80℃로 가열하는 단계;
- (6) 온도를 70 내지 80℃로 유지시키면서 혼합 B상을 혼합 탱크에 첨가하는 단계;
- (7) 온도를 70 내지 80℃에서 유지시키면서 C상 성분을 혼합 탱크에 첨가하는 단계;
- (8) D상 상분을 혼합 탱크에 첨가하고 혼합하고 균질화시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 방법은
  - (a) 균질화를 종료하고 혼합 탱크의 내용물을 50 내지 60℃로 냉각시키는 단계;
  - (b) 혼합을 중단하고 용융된 E상을 혼합 탱크에 첨가하여 분산액을 형성하는 단계;
  - (c) 분산액이 연해지고 균일해질때까지 다시 혼합하는 단계;
  - (d) 혼합 탱크의 내용물을 45 내지 50℃로 냉각시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 50**

- (1) 조성물중 4.00%w/w의 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트, 조성물중 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.5%w/w의 PEG-100을 갖는 A상;
- (2) 2.00%w/w의 글리세린, 1.5%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0%w/w의 에톡시디글리콜, 0.475%w/w의 페녹시에탄올, 40.00%w/w의 카보머 분산액, 16.725%w/w의 정제수를 갖는 B상;
- (3) 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.500%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 락테이트 용액, 2.5%w/w의 물을 갖는 C상;
- (4) 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상; 및
- (5) 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함하는 CoQ10 크림 3%를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 카보머 분산액이 물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜 및 카보머 940을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 52**

- (1) 조성물중 4.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 조성물중 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.5%w/w의 PEG-100을 갖는 A상;
- (2) 2.00%w/w의 글리세린, 1.5%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0%w/w의 에톡시디글리콜, 0.475%w/w의 페녹시에탄올, 40.00%w/w의 카보머 분산액, 16.725%w/w의 정제수를 갖는 B상;
- (3) 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.500%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 락테이트 용액, 2.5%w/w의 물을 갖는 C상;
- (4) 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상 및



(5) 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함하는 CoQ10 크림 3%를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 53**

- (1) 5.000%w/w의 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트, 2.000%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.500%w/w의 PEG-100 스테아레이트를 갖는 A상;
- (2) 2.000%w/w의 글리세린, 1.750%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.000%w/w의 에톡시디글리콜, 0.463%w/w의 페녹시에탄올, 50%w/w의 카보머 분산액, 그리고 11.377%w/w의 정제수를 갖는 B상;
- (3) 1.3%w/w의 트리에탄올아민, 0.400%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 락테이트 용액, 4.210%w/w의 물을 갖는 C상;
- (4) 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상; 및
- (5) 1.500%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함하는, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 54**

- (1) 5.000%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.000%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.500%w/w의 PEG-100 스테아레이트를 갖는 A상;
- (2) 2.000%w/w의 글리세린, 1.750%w/w의 프로필렌, 5.000%w/w의 에톡시디글리콜, 0.463%w/w의 페녹시에탄올, 50%w/w의 카보머 분산액, 11.377%w/w의 정제수를 갖는 B상;
- (3) 1.3%w/w의 트리에탄올아민, 0.400%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 락테이트 용액, 그리고 4.210%w/w의 물을 갖는 C상;
- (4) 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상; 및
- (5) 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함하는, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 55**

제53항에 있어서, 카보머 분산액이 물, 페녹시에탄올 및 프로필렌 글리콜을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 56**

치료되거나 예방되도록 조효소 Q10(CoQ10)을 사람에게 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 사람에서 CoQ10 반응성 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법.

**청구항 57**

제56항에 있어서, CoQ10 반응성 장애가 종양학적 장애인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 “환경대사적 전환인자(조효소 Q10)을 사용하여 종양학적 장애를 치료하는 방법(Attorney docket no.: 117732-00601)” 이란 명칭으로 2009년 5월 11일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/177,241호, “환경대사적 전환인자, 다차원 세포내 분자 또는 환경 영향인자를 사용하여 종양학적 장애를 치료하는 방법(Attorney docket no.: 117732-00701)” 이란 명칭으로 2009년 5월 11일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제 61/177,243호, “환경대사적 전환인자, 다차원 세포내 분자 또는 환경 영향인자를 사용하여 종양학적 장애를 진단하는 방법(Attorney docket no.: 117732-00801)” 이란 명칭으로 2009년 5월 11일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/177,244호, “환경대사적 전환인자, 다차원 세포내 분자 또는 환경 영향인자를 사용하여 대사적 장애를 치료하기 위한 방법(Attorney docket no.: 117732-00901)” 이란 명칭으로 2009년 5월 11일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/177,245호 및 “환경대사적 전환인자, 다차원 세포내 분자 또는 환경 영향인자를 사용하여 대사적 장애를 진단하기 위한 방법(Attorney docket no.: 117732-01001)” 이란 명칭으로 2009년 5월 11일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/177,246호에 대하여 우선권을 주장한다. 상기 출원 각각의 모든 내용은

참조로서 본 명세서에 포함된다.

**배경 기술**

- [0002] 현재 암은 선진국에서 주요 사망원인 중 하나이고, 현대 사회에 심각한 위협요소이다. 암은 모든 나이에서 모든 기관의 모든 조직에서 발생할 수 있다. 전세계에서 천만 명 이상의 사람들이 매년 암으로 진단받고, 이러한 인구는 2020년까지 천오백만 명으로 증가할 것으로 예상된다. 암은 매년 육백만의 죽음을 야기하거나 전세계 사망 원인의 12%를 차지한다고 알려져 있다.
- [0003] 암의 원인은 명확하게 이해되지 않았다. 암은 유전적 민감도, 염색체 절단 이상, 바이러스, 환경요소, 면역이상을 포함하여 다년간에 걸쳐 진행중인 연구의 많은 요소들과 관련되어있거나 연관이 있다. 암은 질병의 큰 범주를 망라한다. 암세포는 신체의 모든 기관 및/또는 조직의 대부분에서 발생할 수 있다. 암은 신체 일부 세포가 통제불능으로 성장하거나 분화하기 시작할 때 발생한다.
- [0004] 최근 연구들이 종양형성의 분자생물학적 기전에 대한 이해를 대단히 높였고 암의 치료를 위한 새롭고도 다양한 길을 제시해 왔으나, 대부분 종양에 대한 표준 치료요법은 여전히 절제술, 항암화학요법, 방사선요법이다. 치료법이 성공적일수록, 각 치료법들은 의도하지 않은 다양한 부작용을 야기할 수 있다. 예를 들어, 수술로 인해 통증, 건강한 조직에 대한 외상성 손상, 흉터가 생길 수 있다. 방사선 요법은 암세포를 사멸시킨다는 장점이 있지만 동시에 비-암성 세포에도 손상을 준다. 항암화학요법은 여러 항암제를 환자에게 주입하는 것을 포함한다. 이러한 표준 치료요법은 때때로 오심, 면역억제, 위궤양, 이차 종양형성과 같은 부작용을 수반한다.
- [0005] 몇 년 동안 많은 개인과 회사들은 방대한 암 치료법을 개선하기 위해 대규모 연구를 수행해왔다. 회사들은 암에 좀 더 효과적인 치료법을 제공하고자 하는 바람으로 저분자 화합물등의 화합물과 항체 등의 생물체제를 포함한 생리활성 물질을 개발해 왔다. 시험된 일부 생리활성 물질들은 효과가 있었고 일부 개인 또는 암종에서 유익한 치료효과를 보였고, 나머지는 시험 프로토콜에서 효과를 입증하지 못하거나 최소의 효과를 보였다. 현재까지 연구된 다른 생리활성 물질들은 기전이 명백하게 이해되지 않았다.
- [0006] 여기에서 CoQ10, Q10, 유비퀴논 또는 유비데카레논이라고도 칭해지는 조효소 Q10은 인기 있는 영양보조제이고, CoQ10의 환원형인 유비퀴놀의 항산화 특성을 통해 면역 체계를 보호하도록 도와주는 비타민 유사 보조식품으로 영양제품 전문점, 건강식품점, 약국 및 유사 상점에서 캡슐 형태로 찾을 수 있다. CoQ10은 잘 알려진 물질이고 여기에서 참고문헌으로 포함된 것의 전체 공개내용은 국제 공개번호 W02005/069916에서 좀 더 자세하게 설명되었다.
- [0007] CoQ10은 인체 대부분 조직과 기타 포유류의 조직에서 발견된다. 인체에서 CoQ10의 조직분포와 산화환원상태는 Bhagavan HN 등이 작성한 리뷰 아티클(총설)인 *Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetic*, Free Radical Research 40(5), 445-453 (2006) (이하 Bhagavan, et al.이라 칭함)에서 검토되었다. 저자들은 “일반적으로 심장, 신장, 간, 근육 등 고에너지를 요하거나 대사활동이 있는 조직은 상대적으로 고농도의 CoQ10을 함유한다” 라고 발표했다. 또한 저자들은 “[a]뇌와 폐를 제외하고는 조직에서 CoQ10이 환원형인 하이드로퀴논 또는 유비퀴놀로 대부분 존재하” 고 “이것은 뇌와 폐 조직에서 증가된 산화 스트레스가 반영되었음을 알수 있다.” 고 발표했다. 특히, Bhagavan et al.은 심장, 신장, 간, 근육, 소장 및 혈액(혈장)에서 각각 75%, 95%, 65%, 95%, 96%의 CoQ10이 환원형이라고 발표했다. 이와 유사하게 Ruiz-Jiminez, et al., *Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress*, J. Chroma A 1175(2), 242-248 (2007) (이하 Ruiz-Jiminez, et al.이라 칭함)는 인간 혈장의 Q10과 Q10 환원형(Q10H2)를 분석했을 때 분자의 대부분(90%)이 환원형이었다고 발표했다.
- [0008] CoQ10은 상당히 지용성이고 보통 물에 녹지 않는다. 물에서의 불용해성과 지질에서의 제한된 용해성 그리고 상대적으로 큰 분자량 때문에 CoQ10의 경구 투여 흡수율은 낮다. Bhagavan, et al.은 “쥐에서 한 어떠한 실험에서, 경구 투여된 CoQ10의 2-3%만이 흡수되었다” 고 밝혔다. Bhagavan, et al.은 또한 “쥐 실험에서의 데이터가 Co10이 소장에서 흡수 중 또는 그 후 유비퀴놀로 환원됨을 보여준다” 고 밝혔다.
- [0009] CoQ10은 수년간의 문헌에서 암과 연관 지어졌다. 문헌에서 보고된 연관성의 전체 예는 아니지만 대표적인 문헌들이 하기 나열되었다. Karl Folkers, et al., *Survival of Cancer Patients on Therapy with Coenzyme Q10*, Biochemical and Biophysical Research Communication 192, 241-245 (1993) (이하 "Folkers, et al."이라 칭함)은 "CoQ10으로 치료받는" 암환자와 그들의 "5-15년간" 생존에 대한 여덟 가지 사례를 설명했다. CoQ10은 처음 체장암, 선암, 후두암, 유방암, 대장암, 폐암, 전립선암을 포함하여 서로 다른 암을 가진 여덟 명의 환자에

게 투여되었다. Folkers, et al.은 "이러한 결과가 프로토콜이 체계적임을 정당화한다"고 발표했다. Lockwood, et al., *Progress on Therapy of Breast Cancer with Vitamin Q10 and the Regression of Metastases*, Biochemical and Biophysical Research Communication 212, 172-177 (1995) (이하 "Lockwood, et al."이라 칭함)은 "비타민 Q10 유방암 치료요법의 진전"에 대해 발표한 또 다른 리뷰 아티클이다. Lockwood, et al.은 "비암종 조직과 암조직에서 비타민 Q10의 다양한 수준을 밝힌 동물과 인간에 대한 35년간의 국제적 연구를 다루고 암이 있는 쥐에서 Q10 처리가 생존을 증가시킨다는 점에 기초하여 숙주방어 체계에 본질적인 비타민 Q10에 대한 데이터를 포함하는" Folkers, et al.을 인용했다. 뿐만 아니라 Lockwood, et al.은 199명의 스웨덴과 미국의 암 환자에서 혈액 내 CoQ10의 수준을 밝히고 유방암의 경우 CoQ10이 다양하게 결핍되었음을 밝혀낸 연구를 바탕으로 "인간의 암을 비타민 Q10으로 치료하는 것에 대한 가능성이 1961년 명백해졌다"고 발표했다. 2002년 7월 9일 발행된 미국 특허번호 6,417,233 (이하 Sears, et al)은 조효소 Q10과 같은 지용성 벤조퀴논을 포함한 조성물의 사립체병증(mitochondriopathy)의 예방 및/또는 치료법에 대해 설명했다. Sears, et al.은 "CoQ10 치료법이 암환자에게 효과가 있다고 보고되었다."고 발표했다. (2단 30-31줄 참고)

[0010] 본 출원의 출원일자에, 국립 암 연구소(NCI)는 "시험이 수행된 방식과 현재까지 보고된 정보의 양이 조효소 Q10이 치료적 유익을 야기하는지 아니면 다른 무언가 때문인지 불분명하게 했기" 때문에 제대로 디자인된 CoQ10으로 암 치료를 받는 환자들을 대규모 포함한 임상시험이 수행된 적이 없다고 밝혔다. [www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/coenzymeQ10/patient/all](http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/coenzymeQ10/patient/all) (중양학적 장애s (2008년 9월 29일)에서 국립 암 연구소(NCI) 참고. 특히 NCI는 유방암 환자의 표준 치료요법에 보조치료로 CoQ10을 사용한 세 개의 소규모 시험에서 일부 환자가 그 치료법에 도움을 받았으나 "시험 디자인과 보도에서의 약점이 치료적 유익이 조효소 Q10 때문인지 아니면 다른 무언가 때문인지 불분명하게 만들었다."고 말했다. NCI는 "세 개의 시험에 다음의 약점이 있었다: 시험이 무작위 배정되지 않았거나 대조군이 없었다; 환자들이 조효소 Q10 외에 다른 보조제품을 사용했다; 조효소 Q10 치료 전 또는 그 중간에 환자들은 표준 치료요법을 받고 있었다; 시험의 모든 환자에 대한 세부사항이 보고되지 않았다"고 밝혔다. 또한 NCI는 "조효소 Q10이 췌장, 폐, 대장, 직장, 전립선에 암이 있는 환자를 포함하여 일부 암환자가 오래 살기를 도왔다는 일화성 기록"을 발표했으나 '이러한 보고서에 설명된 환자들은 조효소 Q10 외에도 화학치료요법, 방사선 요법 및 수술을 포함한 다른 치료 역시 받았다.'라고 말했다.

[0011] 2006년 2월 16일에 공개된 미국 특허 출원공개공보 2006/0035981 (이하 "Mazzio 2006"라 칭함)는 숙주와는 정반대의 에너지를 생산하기 위해 포도당의 비-산화성 인산화과정에 필요한 혐기성에 관련된 암의 취약성을 이용하는 구성요소를 이용하여 인간과 동물의 암을 치료하거나 억제하는 방법과 제조물을 설명하고 있다. Mazzio 2006의 제조법은 상승적으로 산화대사를 촉진 및/또는 유당 테하이드로게나제 또는 무산소성(혐기성) 당대사를 지연시키며 더 세부적으로는 "2,3-디메톡시-5-메칠-1,4-벤조퀴논(이하 "DBMQ"라 칭함)(quinoid base)"과 전체 하이드로퀴논, 유비크로메놀, 유비크로마놀 또는 합성/천연 유도체 및 유사체를 포함한 전체 유비퀴논군의 옵션을 포함하는 하나 또는 그 이상의 물질을 함유한다. Mazzio 2006의 단락 0010 참고. Mazzio 2006은 "항암 물질로서의 저급 유비퀴논(CoQ<3)과 2,3-디메톡시-5-메칠-1,4-벤조퀴논(DBMQ)이 항암물질로서 CoQ10에 비해 1,000배 이상 강력하다"고 밝혔다. Mazzio 2006 3쪽 0011단락 참고. 추가적으로 Mazzio 2006은 연구에서 "CoQ10이 기대한만큼 치명적이지 않았"고 "암에 CoQ10을 사용한 이전 연구와 대조적이었다."라고 밝혔다. 본 설명을 뒷받침하는 인용목록에 대해 Mazzio 2006 3-4쪽 참고.

[0012] 2007년 10월 25일에 발행된 미국 특허 공개번호 2007/0248693(이하 "Mazzio 2007"이라 칭함)에서 암을 치료하거나 예방하는 영양학적 조성물과 그것의 이용에 대해 설명했다. 또한, 본 공개된 특허 출원은 저급 유비퀴논을 집중적으로 다루고 있고 특히 CoQ10이 본 발명의 중요한 요소가 아님을 밝혔다. Mazzio 2007에 따르면 "CoQ10이 암세포에서 미토콘드리아 복합체 2 활성의 최대속도(Vmax)를 증가시킬 수 있는 반면에(Mazzio and Soliman, Biochem Pharmacol. 67:1167-84, 2004), CoQ10이 미토콘드리아 호흡 또는 복합체 4를 통한 O2 이용을 통제하지 않았다. 그리고 CoQ10은 기대한만큼 치사적이지 않았다. 마찬가지로, CoQ10의 항암효과는 모순적이었다." Mazzio 2007 5쪽 0019단락 참고.

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 출원인은 이전에 CoQ10 제형과 동물 대상 암 성장률을 감소시키기 위한 방법(Hsia et al., 2005년 8월 4일 공개한 WO 2005/069916)을 기재하였었다. Hsia et al.에서 기재한 실험에서, CoQ10은 정상 세포가 아닌 표피 암 세포 배양에서 세포 사멸률을 증가시켰다. 게다가, CoQ10의 국소 제형으로의 암 투병 동물 치료는 동물의 암 성장률을 현저히 감소시켰다. 본 발명은 적어도 일부로서 인간 및/또는 세포내 CoQ10 역할의 보다 완벽한 이해에 기반한다. 특히, 본 발명의 방법과 제형은, 적어도 일부로서 인간 임상 실험을 설계 및 시행하고/하거나 인간을 대상으로 CoQ10을 투여하고 이러한 실험 및/또는 치료 요법 동안 발생하는 놀랍고 기대치 않은 결과를 관찰함으

로써 얻어지는 종양학적 장애를 위한 CoQ10의 치료학적 활성화에 대하여 습득된 지식에 기반한다. 또한, 본 발명의 방법과 제형은 적어도 일부로서, 시험관에서 세포내 CoQ10 치료에 대한 광범위한 연구로부터 얻어지는 CoQ10의 치료학적 기전에 대한 통찰에 기반한다.

[0015] 특별히, 적어도 하나의 구체예에서, 본 발명의 방법과 제형은 적어도 일부로서, 세포에 대한 조효소 Q10(본 명세서에서, CoQ10 또는 Q10으로 지칭됨)의 적용이 정상 세포의 성장에는 효과가 없거나, 일부 긍정적인 효과를 주면서도 암 세포에는 세포 사멸적 반응의 선택적 유도를 초래한다는 놀라운 발견에 기반한다. 게다가, 적어도 하나의 추가적인 구체예에서는, 뜻밖에도 공격적인 암으로부터 유도되는 세포주가 비-공격적 암 또는 덜 공격적인 암으로부터 유도되는 세포주와 비교하여, CoQ10에 더 민감하다(예를 들어, 세포 독성 및/또는 세포 사멸 유도에 있어 더 낮은 CoQ10의 농도 및/또는 CoQ10의 치료 시간을 요구함)는 것을 알게 되었다. 미토콘드리아성 Q10 시간 및 복용 응답 수준이 관찰되었는데, 48시간 이후, 세포 미토콘드리아 내 Q10의 수준이 6배로 증가하였다. 적어도 하나의 구체예에서, 추가적으로 본 발명은 Q10이 공급된 산화 형태(pro-oxidant)로 유지되며 의미있는 양으로서 Q10H2의 환원된 형태로는 변환되지 않는다는 놀랍고도 기대치 않은 발견에 기반한다. 또 다른 구체예에서, 추가적으로 본 발명은 Q10의 산화 형태로 처리된 세포내에서 중요한 유전자 수의 발현이 조절된다는 발견에 여전히 기반한다. 이러한 조절된 단백질은 세포 사멸, 종양 생물학 및 세포 성장, 당분해 및 대사, 분자 이동, 그리고 세포 신호법(signalling)을 포함하는 여러 세포 경로로 묶여질 수 있음을 발견하였다.

[0016] 종합해보면, 본원에서 기술하는 결과는 Q10의 치료학적 기전에 대한 통찰을 제공한다. 이론에 구속되는 것을 바라지는 않으나, 예를 들면, 본 출원인의 발견은 Q10 및 특히, Q10의 산화 형태는 세포 미소환경의 대사적 변환을 유도한다. 암 세포내 차별화되는 대사로서, 암 세포는 미토콘드리아 내 산화적 인산화(피루베이트의 산화)보다 시토졸 내 당분해와 이어지는 젖산 발효에 의한 에너지 생산이 더 우선적으로 일어난다고 알려져 있다. 본 출원인의 발견은 Q10이 글루코스의 혐기적 사용으로부터 미토콘드리아성 산화적 인산화로 암세포의 대사 상태를 변환시킬 수 있음을 지적한다.

[0017] 따라서, 본 발명은 하나의 측면에서, 치료되거나 예방되도록 조효소 Q10(Coenzyme Q10)을 사람에게 투여함에 의해 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, CoQ10은 종양학적 장애의 암 세포에서 아포토시스 또는 세포 사멸 기작을 유도한다. 다른 양태에서, CoQ10은 종양학적 장애의 암 세포에서 혈관형성을 억제한다. 특정 다른 양태에서, CoQ10은 종양학적 장애의 암 세포에서 미세환경내 면역관련 요소를 조절하고 다른 양태에서 CoQ10은 종양학적 장애의 암 세포에서 세포 주기 조절의 변화를 유도한다. 하나의 양태에서, 사람에서 치료될 특정 장애에 대한 효능을 제공하기 위해 선택된 용량으로 국소 투여된다. 특정 양태에서, 장애의 치료 또는 예방은 조효소 Q10의 산화된 형태를 투여하여 수행한다.

[0018] 하나의 구체예에서, 다수의 인간이 치료되며, 그 인간의 적어도 25%가, 조직 병리학, 임상 관찰, 사진 판독, CT-스캔, MRI 이미징, 혈액, 혈청 또는 암의 혈장 마커를 포함하는 당업계에 알려진 종점(endpoint)에 의해 측정된 것으로서, 증상의 약화를 가진다. 하나의 구체예에서, 다수의 인간이 치료되며, 그 인간의 적어도 50%가 조직 병리학, 임상 관찰, 사진 판독, CT-스캔, MRI 이미징, 혈액, 혈청 또는 암의 혈장 마커 및 치료 전 후 치료된 부위의 물리적 측정을 포함하는 당업계에 알려진 종점에 의해 측정된 것으로서, 증상의 약화를 가진다. 다른 구체예에서, 다수의 인간이 치료되며, 그 인간의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 혹은 그 이상이 조직 병리학, 임상 관찰, 사진 판독, CT-스캔, MRI 이미징, 혈액, 혈청 또는 암의 혈장 마커를 포함하는 당업계에 알려진 종점에 의해 측정된 것으로서, 증상의 약화를 가진다. 이들 값 중 어느 하나를 상한 또는 하한값으로 갖는 범위, 예를 들어 10% 내지 25%, 15% 내지 35%, 25% 내지 50%, 35% 내지 60%, 40% 내지 70%, 50% 내지 75%, 60% 내지 85%, 또는 70% 내지 90% 역시 본 발명의 일부로서 의도된 것임을 이해하여야 한다.

[0019] 다양한 구체예에서, 치료된 다수의 인간은 약 3명의 환자, 약 5명의 환자, 약 10명의 환자, 약 15명의 환자, 약 20명의 환자, 약 25명의 환자, 약 30명의 환자, 약 35명의 환자, 약 40명의 환자, 약 50명의 환자, 약 60명의 환자, 약 70명의 환자, 약 80명의 환자, 약 90명의 환자, 약 100명의 환자, 약 125명의 환자, 약 150명의 환자, 약 160명의 환자, 약 175명의 환자, 약 200명의 환자, 약 250명의 환자, 약 300명의 환자, 약 400명의 환자 또는 그 이상이다. 하나의 구체예에서, 치료된 다수의 인간은 상기 값 중 어느 하나를 상한 또는 하한값으로 갖는 범위, 예를 들어 약 10 내지 약 25, 약 15 내지 약 35, 약 25 내지 약 50 또는 약 20 내지 약 160 명의 환자 역시 본 발명의 일부로서 의도된 것임을 이해하여야 한다.

[0020] 하나 이상의 당업계에 알려진 종점 조사법 하에서, 당업자들은 환자들이 당업계의 상식에 기반하여 증상의 완화를 갖게 됨을 인식할 수 있다고 이해될 것이다. 예를 들어, 당업자는 치료 전후에, in situ 피부 편평 세포암과

같은 피부암 병변의 사진(예를 들면, 본원의 실시예에서 제공된 사진)을 조사하고 비교할 수 있을 것이고, 예를 들면, 병변의 크기, 병변의 색깔 또는 암에 대해 일반적으로 지시적인 다른 어떤 병변의 특징의 완화에 기반하여 증상의 완화를 인식할 수 있다. 또 다른 예에서, 당업자는 치료 전후에, 예를 들면 피부암의 조직 병리를 조사하고 비교할 수 있을 것이고, 예를 들면 종양 형성력(oncogenicity) 또는 암의 격렬한 정도에 있어서의 완화를 지시해주는 조직 병리상의 변화에 기반하여 증상의 완화를 인식할 수 있다. 또 다른 예로, 당업자는 치료 전후의 CT-스캔 또는 암의 MRI 이미지 또는 전이 병변 위치를 조사하고 비교할 수 있을 것이고, 예를 들면, 최종 암의 크기 완화 또는 전이 병변의 크기 또는 수의 완화에 기반하여 증상의 완화를 인식할 수 있을 것이다.

- [0021] 하나의 양태에서, 표재성 기저세포암종을 갖는 사람 환자 집단(예를 들어, 약 160명의 환자)은 위약 크림 (0% CoQ10), 국소 크림 기제내 위약 + 3중량%의 CoQ10, 1.5중량%의 CoQ10 크림 + 3중량%의 CoQ10 크림, 또는 3중량%의 CoQ10 크림 단독으로 처리하고 총 환자 집단중 25% 이상에서, 조직 병리학, 조련된 전문가에 의한 임상적 관찰, 사진촬영 분석, CT-스캔, MRI 이미지화, 암의 혈액, 혈청 또는 혈장 마커, 치료 전후 처리된 부위의 물리적 측정, 치료 전후 처리된 sBCC에 대한 병리학적 조사 및 디지털 고-해상도 임상적 사진촬영을 포함하는 당업계에 공지된 종점(endpoint)에 의한 측정시 증상이 감소하였다.
- [0022] 하나의 양태에서, 원위치 편평상피세포암종(SCCIS)을 갖는 사람 환자 집단(예를 들어, 약 25명의 환자)은 비교적 짧은 치료 과정동안(6주 대 16 내지 20주 표준 치료) 3중량%의 조효소 Q10을 함유하는 크림으로 처리하고 상기 집단 중 50% 이상에서 조직 병리학, 조련된 전문가에 의한 임상적 관찰, 사진촬영 분석, CT-스캔, MRI 이미지화, 암의 혈액, 혈청 또는 혈장 마커, 치료 전후 처리된 부위의 물리적 측정, 치료 전후 처리된 sBCC에 대한 병리학적 조사 및 디지털 고-해상도 임상적 사진촬영을 포함하는 당업계에 공지된 종점(endpoint)에 의한 측정시 증상이 감소하였다..
- [0023] 하나의 양태에서, 사람 집단을 처리하고 집단중 25% 이상이 치료되는 장애에 대해 치료학적 전신성 조효소 Q10 수준을 가졌다. 다른 양태에서, 사람 집단을 처리하고 상기 집단중 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상이 치료되는 장애에 대해 치료학적 전신성 조효소 Q10 수준을 가졌다. 상한치 또는 하한치로서 이들 수치중 어느 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 10% 내지 25%, 15% 내지 35%, 25% 내지 50%, 35% 내지 60%, 40% 내지 70%, 50% 내지 75%, 60% 내지 85% 또는 70% 내지 90%는 또한 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.
- [0024] 특정 양태에서, 치료되거나 예방되는 종양학적 장애는 치료학적 유효 수준으로 활성제를 전신 투여시 예상되는, 전형적으로 국소적 투여에 의해 치료되거나 예방되는 장애가 아니다.
- [0025] 몇몇 양태에서, 치료되는 사람 조직내 조효소 Q10의 농도는 건강하거나 정상 상태인 사람 조직의 대조군 표준의 농도와는 상이하다.
- [0026] 본 발명의 특정 다른 양태에서, 사람에게 투여되는 조효소 Q10의 형태는 사람 내 전신 순환계에서 발견되는 주요 형태와는 상이하다.
- [0027] 본 발명의 특정 양태에서, 상기 방법은 치료되거나 예방되도록 조효소 Q10을 사람에게 국소 투여함에 의해 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위해 제공되고, 이때 사람에게 국소 비히클중에 국소 용량의 조효소 Q10이 투여되고 여기서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 조효 Q10 약 0.01 내지 약 0.5mg의 범위로 표적 조직에 적용된다. 하나의 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.09 내지 약 0.15mg의 범위로 표적 조직에 적용된다. 다양한 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.001 내지 약 5.0, 약 0.005 내지 약 1.0, 약 0.005 내지 약 0.5, 약 0.01 내지 약 0.5, 약 0.025 내지 약 0.5, 약 0.05 내지 약 0.4, 약 0.05 내지 약 0.30, 약 0.10 내지 약 0.25, 또는 약 0.10 내지 0.20 mg의 범위로 표적 조직에 투여된다. 다른 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49 또는 0.5 mg의 용량으로 표적 조직에 적용된다. 하나의 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.12 mg의 용량으로 표적 조직에 적용된다. 상한치 또는 하한치로서 이들 수치중 어느 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 피부 평방 센티미터당 CoQ10 약 0.03 내지 약 0.12, 약 0.05 내지 약 0.15, 약 0.1 내지 약 0.20, 또는 약 0.32 내지 약 0.49 mg은 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 0.5 내지 10mg의 CoQ10 크림 용량으로

CoQ10 크림 형태로 투여되고, 여기서, 상기 CoQ10 크림은 1 내지 5%의 조효소 Q10을 포함한다. 하나의 양태에서, CoQ10 크림은 약 3%의 조효소 Q10을 포함한다. 다른 양태에서, CoQ10 크림은 약 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5%의 조효소 Q10을 포함한다. 다양한 양태에서, CoQ10 크림은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 크림 약 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 또는 10mg의 용량으로 투여된다. 상한치 또는 하한치로서 이들 수치중 어느 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 피부 평방 센티미터당 CoQ10 크림 약 0.5 내지 약 5.0, 약 1.5 내지 2.5, 또는 약 2.5 내지 5.5mg은 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 조효소 Q10은 피부 평방 센티미터 당 CoQ10 크림 3 내지 5mg의 용량으로 CoQ10 크림 형태로 투여되고, 여기서, CoQ10 크림은 1 내지 5%의 조효소 Q10을 포함한다. 하나의 양태에서, CoQ10 크림은 조효소 Q10 약 3%를 포함한다. 다른 양태에서, CoQ10 크림은 조효소 Q10 약 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5%를 포함한다. 다양한 양태에서, CoQ10 크림은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 크림 약 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0mg의 용량으로 투여된다. 상한치 또는 하한치로서 상기 수치중 어느 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 피부의 센티미터당 CoQ10 크림 약 3.0 내지 약 4.0, 약 3.3 내지 5.3, 또는 약 4.5 내지 4.9 mg은 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.

[0030] 본 발명의 특정 양태에서, 치료되거나 예방되는 종양학적 장애는 편평상피세포암종이다. 특정 다른 양태에서, 치료되거나 예방되는 종양학적 장애는 기저세포암종이다. 본 발명의 다른 양태에서, 예방되는 종양학적 장애는 SCC이고, 상기 방법은 예비 암 병변 광선 각화증이 SCC로 진행되는 것을 예방한다. 다른 양태에서, 치료되거나 예방되는 종양학적 장애는 흑색종이다.

[0031] 본 발명의 특정 측면은 치료되거나 예방되도록 조효소 Q10을 사람에게 국소적으로 투여함에 의해 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 이때 조효소 Q10은 6주 이상 동안 24시간 마다 1회 이상 국소적으로 투여된다.

[0032] 본 발명은 또한 또 다른 측면에서 사람에서 공격성 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 이들 방법은 공격성 종양학적 장애가 치료되거나 예방되도록, 덜 공격성이거나 비-공격성인 종양학적 장애에 대해 사용되거나 선택된 용량 치료 보다 낮게 선택된 용량으로 조효소 Q10을 사람에게 투여함을 포함한다. 특정 양태에서, 공격성 종양학적 장애는 췌장 암종, 간세포 암종, 어빙 육종(Ewing sarcoma), 전이성 유방암, 전이성 흑색종, 뇌암(성상세포종, 교모세포종), 신경내분비암, 결장암, 폐암, 골육종, 안드로겐 관련없는 췌장암, 난소암 및 비-호지킨 림프종을 포함한다. 관련 측면에서, 본 발명은, 비공격성 종양학적 장애가 치료되거나 예방되도록, 공격성 종양학적 장애에 대해 사용되거나 선택된 용량 계획 보다 높게 선택된 용량으로 조효소 Q10을 사람에게 투여함을 포함하는, 사람에서 비공격성 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 비공격성 종양학적 장애는 비전이성 유방암, 안드로겐 의존성 전립선 암, 소세포폐암 및 급성 림프구 백혈병을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 중간체는 (a) 벤조퀴논 또는 벤조퀴논 환의 합성을 촉진시키는 하나 이상의 분자 및 (b) 이소프레노이드 유닛의 합성 및/또는 이의 벤조퀴논 환으로의 부착을 촉진시키는 하나 이상의 분자를 포함한다. 다른 양태에서, 벤조퀴논 환의 생합성을 촉진시키는 하나 이상의 분자는: L-페닐알라닌, DL-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-티로신, DL-티로신, D-티로신, 4-하이드록시-페닐피루베이트, 3-메톡시-4-하이드록시만델레이트(바닐릴만델레이트 또는 VMA), 바닐릴산, 피리독신, 또는 판테놀을 포함한다. 다른 양태에서, 이소프레노이드 유닛의 합성 및/또는 이의 벤조퀴논 환으로의 부착을 촉진시키는 하나 이상의 분자는: 페닐아세테이트, 4-하이드록시-벤조에이트, 메발론산, 아세틸글리신, 아세틸-CoA, 또는 파르네실을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 중간체는 (a) L-페닐알라닌, L-티로신 및 4-하이드록시페닐피루베이트 중 하나 이상 및 (b) 4-하이드록시 벤조에이트, 페닐아세테이트 및 벤조퀴논 중 하나 이상을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 중간체는: (a) Bcl-2 발현을 억제하고/하거나 카스파제-3 발현을 촉진시키고/시키거나 (b) 세포 증식을 억제한다. 이들 보다 낮은 용량이 공격성 종양학적 장애에 대해 치료학적이고 보다 높은 용량이 비공격성 종양학적 장애에 대해 치료학적인지는 예상되지 않았었다.

[0033] 공격성 종양학적 장애의 치료를 위해 선택된 CoQ10의 보다 낮은 용량은 덜 공격성 또는 비공격성 종양학적 장애에 대해 전형적으로 사용되거나 선택되는 용량 계획 보다 낮은 용량을 포함하는 것으로 의도된다. 다양한 양태에서, CoQ10의 선택된 보다 낮은 용량은 덜 공격성 또는 비공격성 종양학적 장애에 대해 전형적으로 사용되거나 선택되는 용량 계획 보다 약 1.5배 낮거나, 약 2배 낮거나, 약 3배 낮거나, 약 4배 낮거나, 약 5배 낮거나 약 10배 낮다. CoQ10의 선택된 보다 낮은 용량은 덜 공격성 또는 비공격성 종양학적 장애에 대해 전형적으로 사용되거나 선택된 치료 시간 또는 투여 프로토콜과 비교하여 CoQ10의 보다 짧은 치료 기간(예를 들어, 1.5배, 2배,

3배, 4배, 5배 또는 10배 짧은 기간) 또는 CoQ10의 덜 빈번한 투여(예를 들어, 빈번한 투여 횟수의 절반, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배 또는 24배 덜 빈번한 횟수) 횟수를 나타내는 것으로 이해된다. 다양한 양태에서, 공격성 종양학적 장애의 치료를 위한 조효소 Q10의 선택된 보다 낮은 용량은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.0001 내지 약 5.0, 약 0.001 내지 약 1.0, 약 0.001 내지 약 0.5, 약 0.001 내지 약 0.4, 그리고 0.001 내지 약 0.30, 약 0.001 내지 약 0.25, 약 0.001 내지 약 0.20, 약 0.001 내지 약 0.12, 또는 약 0.001 내지 약 0.09 mg을 포함한다. 다른 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.0001, 0.001, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49 또는 0.5 mg의 용량으로 표적 조직에 적용된다. 상한치 또는 하한치로부터 이들 값중 임의의 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.005 내지 약 0.09mg은 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.

[0034] 비공격성 종양학적 장애의 치료를 위해 CoQ10의 선택된 보다 높은 용량은 공격성 종양학적 장애를 위해 전형적으로 사용되거나 선택된 용량 계획 보다 높은 용량을 포함하는 것으로 의도된다. 다양한 양태에서, 선택된 보다 높은 용량의 CoQ10은 공격성 종양학적 장애에 대해 전형적으로 사용되거나 선택된 용량 계획 보다 약 1.5배, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배 또는 약 10배 높다. CoQ10의 선택된 보다 낮은 용량은 공격성 종양학적 장애에 대해 전형적으로 사용되거나 선택되는 치료기간 또는 투여 프로토콜과 비교하여 CoQ10의 보다 긴 치료 기간(예를 들어, 1.5배, 2배, 3배, 4 배, 5배 또는 10배의 보다 긴 치료 기간) 또는 CoQ10의 보다 더 빈번한 투여(예를 들어, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배 또는 24배 이상 빈번한)를 포함한다. 다양한 양태에서, 공격성 종양학적 장애의 치료를 위해 Q10의 선택된 보다 높은 용량은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.001 내지 약 10.0, 약 0.005 내지 약 10.0, 약 0.01 내지 약 10.0, 약 0.05 내지 약 5.0, 약 0.05 내지 약 2.0, 약 0.05 내지 약 1.0, 약 0.05 내지 약 0.7, 약 0.10 내지 약 0.50, 또는 약 0.12 내지 0.5 mg을 포함한다. 다른 양태에서, 조효소 Q10은 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.001, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg., 0.8 mg., 0.9 mg 또는 1.0 mg의 용량으로 표적 조직에 적용된다. 상한치 또는 하한치로서 이들 값중 어느 하나를 갖는 범위, 예를 들어, 피부의 평방 센티미터 당 CoQ10 약 0.15 내지 약 0.5mg은 본 발명의 일부로 의도되는 것으로 이해되어야만 한다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 종양학적 장애의 치료 동안에 이의 산화된 형태로 유지되도록 조효소 Q10을 사람에게 투여함을 포함하는, 사람에서 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 하나의 구체예에서, 치료될 종양학적 장애는 국소 투여를 거쳐 일반적으로 처리되는 장애, 예를 들면 치료학적 유효 수준으로 활성제제의 체계적 전달이 기대되는 유방암 또는 고환암이 아니다.

[0036] 본 발명은 또 다른 측면에서, 글루코스의 혐기성 사용을 차단하고 사람에서 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 방법을 제공한다. 이들 방법은 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하거나 치료하고 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서 중간체를 상기 사람에게 투여하여 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시킴을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 방법은 HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토졸 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스무타제 2, VDAC, 박스 채널(Bax channel), ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C 및 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 및 표 2 내지 4 및 6 내지 28에 열거된 임의의 하나 이상의 유전자의 발현을 상향조절하고/하거나 HNF4-알파, Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 사이토졸 인자 2, 산화질소 신타제 2A, 슈퍼옥사이드 디스무타제 2, VDAC, 박스 채널, ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C 및 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현을 하향조절하여 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시킴을 포함한다.

[0037] 본 발명은 관련 측면에서 사람에서 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 방법을 제공하고 상기 방법은 공격성 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하고 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서 중간체를 상기 사람에게 투여하여 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고

미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시킴을 포함한다. 몇몇 양태에서, 종양학적 장애는 췌장암, 간암, 어빙 육종 (Ewing's sarcoma), 전이성 유방암, 전이성 악성 흑색종, 뇌종양(성상세포종, 교모세포종), 신경내분비암, 대장암, 폐암, 골육종, 안드로겐-비의존성 고환암, 난소암 및 비호지킨 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0038] 본 발명은 관련 측면에서, 사람에서 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시키는 방법을 제공한다. 이들 방법은 비공격성 종양학적 장애를 앓는 사람 피검체를 선별하고 치료학적 유효량의 조효소 Q10 또는 조효소 Q10 생합성 경로에서의 중간체를 사람에게 투여하여 글루코스의 혐기적 사용을 차단하고 미토콘드리아 산화성 인산화를 증강시킴을 포함한다. 몇몇 양태에서, 종양학적 장애는 비전이성 유방암, 안드로겐-비의존성 고환암, 소세포 폐암 및 급성 림프구성 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 사람에서 종양학적 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 과정은 사람의 세포막 투과성이 조절되어 치료되도록 하는 투여 계획에서 조효소 Q10을 이를 필요로 하는 사람에게 투여함을 포함한다.

[0040] 본 발명의 몇몇 양태에서, 종양학적 장애의 치료 또는 예방은 CoQ10과, HNF4- $\alpha$ , Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 시토졸 인자 2, 산화질소 합성효소 2A, 과산화물 제거효소2, VDAC, Bax 통로, ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C, 그리고 Cam 키나제 II로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 및 표 2-4, 6-28에 목록화된 유전자 중 임의의 하나 이상과의 상호작용을 통해 일어난다. 몇몇 양태에서, 종양학적 장애는 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종 또는 육종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명의 특정 양태에서, 종양학적 장애는 백혈병, 림프종, 흑색종, 암종 및 육종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0042] 본 발명의 특정 양태에서, 상기 방법은 수술, 방사선, 호르몬 치료, 항체 치료, 성장인자들을 사용한 치료, 사이토킨, 그리고 화학치료요법 중 임의의 하나 또는 이의 조합을 포함하는 치료 계획을 추가로 포함한다.

[0043] 본 발명의 특정 측면은 A상, B상, C상, D상 및 E상을 제조하고 3% CoQ10 크림의 수중유 에멀전이 형성되도록 모든 상을 조합하는 단계를 포함하는 조효소 Q10 크림 3%를 제조하기 위한 방법을 제공한다.

[0044] 몇몇 양태에서, A상 성분은 4.00 %w/w의 알킬 C<sub>12-15</sub> 벤조에이트 NF, 2.00%w/w의 세틸 알콜 NF, 4.5%w/w의 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 및 1.50%w/w의 스테아릴 알콜NF를 포함하고, B상 성분은 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP 및 40.00%w/w의 카보머 분산액 2%를 포함하고 C상 성분은 0.50%w/w의 락트산 USP, 2.00%w/w의 나트륨 젖산 용액 USP, 1.30%w/w의 트롤라민 NF, 그리고 2.50%w/w의 정제수 USP를 포함한다. 추가로 이들 양태에서, D상 성분은 1.00%w/w의 이산화티탄을 포함하고 E상 성분은 15%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 포함한다.

[0045] 특정 다른 양태에서, A상 성분은 4.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.00%w/w의 세틸 알콜 NF, 4.5%의 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 및 1.5%w/w의 스테아릴 알콜을 포함하고 B상 성분은 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP 및 40.00%w/w의 카보머 분산액 2%를 포함하고 C상 성분은 0.50%w/w의 락트산 USP, 2.00%w/w의 나트륨 젖산 용액 USP, 1.30%w/w의 트롤라민 NF 및 2.50%w/w의 정제수 USP를 포함한다. 이들 양태에서 추가로 D상 성분은 1.00%w/w의 이산화티탄 USP를 포함하고 E상 성분은 15%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 포함한다.

[0046] 본 발명의 특정 양태에서, (1) A상 성분을 적합한 용기에 첨가하고 수욕조에서 70 내지 80°C로 가열하는 단계; (2) 카보머 분산액을 배제한 B상 성분을 적합한 용기에 첨가하고 혼합하여 혼합 B상을 형성하는 단계; (3) E상 성분을 적합한 용기에 위치시키고 이들을 수욕조를 사용하여 50 내지 60°C에서 용융시켜 용융된 E상을 형성하는 단계; (4) 카보머 분산액을 혼합 탱크에 첨가하고 혼합하면서 70 내지 80°C로 가열하는 단계; (5) 온도를 70 내지 80°C로 유지시키면서 혼합 B상을 혼합 탱크에 첨가하고; (6) 온도를 70 내지 80°C에서 유지시키면서 C상 성분을 혼합 탱크에 첨가하고 ; (7) D상 상분을 혼합 탱크에 첨가함에 이어서 계속 혼합 탱크의 내용물을 계속 혼합하고 균질화시키는 단계; 이어서 (8) 균질화를 종료하고 혼합 탱크의 내용물을 50 내지 60°C로 냉각시키는 단계; 이어서 (9) 혼합을 중단하고 용융된 E상을 혼합 탱크에 첨가하여 분산액을 형성하는 단계; (10) 이어서 분산액이 연해지고 균일해질때까지 다시 혼합하는 단계; 이어서 (11) 혼합 탱크의 내용물을 45 내지 50°C로 냉각



시키는 단계를 포함하는 조효소 Q10 크림 3%를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0047] 본 발명의 몇몇 다른 양태에서, CoQ10 크림 3%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 크림은 조성물중 4.00%w/w의 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트, 조성물중 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.5%w/w의 PEG-100을 갖는 A상; 2.00%w/w의 글리세린, 1.5%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0%w/w의 에톡시디글리콜, 0.475%w/w의 페녹시에탄올, 40.00%w/w의 카보머 분산액, 16.725%w/w의 정제수를 갖는 B상; 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.500%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 젯산 용액, 2.5%w/w의 물을 갖는 C상; 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상; 및 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함한다. 몇몇 양태에서, 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜 및 카보머 940을 포함한다.

[0048] 본 발명의 몇몇 다른 양태에서, CoQ10 크림 3%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 크림은 조성물중 4.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 조성물중 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.5%w/w의 PEG-100을 갖는 A상; 2.00%w/w의 글리세린, 1.5%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0%w/w의 에톡시디글리콜, 0.475%w/w의 페녹시에탄올, 40.00%w/w의 카보머 분산액, 16.725%w/w의 정제수를 갖는 B상; 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.500%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 젯산 용액, 2.5%w/w의 물을 갖는 C상; 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상 및 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함한다. 몇몇 양태에서, 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜 및 카보머 940을 포함한다.

[0049] 본 발명의 몇몇 다른 양태에서, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 크림은 조성물중 5.00%w/w의 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트, 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.500%w/w의 PEG-100 스테아레이트를 갖는 A상; 2.00%w/w의 글리세린, 1.750%w/w의 프로필렌, 5.00%w/w의 에톡시디글리콜, 0.463%w/w의 페녹시에탄올, 50.00%w/w의 카보머 분산액, 그리고 11.377%w/w의 정제수를 갖는 B상; 1.3%w/w의 트리에탄올아민, 0.400%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 젯산 용액, 4.210%w/w의 물을 갖는 C상; 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상; 및 1.500%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함한다.

[0050] 본 발명의 몇몇 다른 양태에서, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 크림은 5.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.00%w/w의 세틸 알콜, 1.5%w/w의 스테아릴 알콜, 글리세릴 스테아레이트 및 4.500%w/w의 PEG-100 스테아레이트를 갖는 A상; 2.00%w/w의 글리세린, 1.750%w/w의 프로필렌, 5.000%w/w의 에톡시디글리콜, 0.463%w/w의 페녹시에탄올, 50%w/w의 카보머 분산액, 11.377%w/w의 정제수를 갖는 B상; 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.400%w/w의 락트산, 2.000%w/w의 나트륨 젯산 용액, 그리고 4.210%w/w의 물을 갖는 C상; 1.000%w/w의 이산화티탄을 갖는 D상 및 15.000%w/w의 CoQ10 21% 농축물을 갖는 E상을 포함한다. 몇몇 양태에서, 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올, 그리고 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0051] 특정 양태에서, 상기 방법은 치료되거나 예방되도록 사람에게 조효소 Q10(CoQ10)을 국소적으로 투여함을 포함하는, 사람에서 CoQ10 반응성 장애를 치료하거나 예방하기 위해 제공된다. 특정 다른 양태에서, CoQ10 반응성 장애는 종양학적 장애이다.

**도면의 간단한 설명**

[0052] 본 발명의 다양한 양태는 하기에 본원에서 도면을 참조로 기재될 것이다:

- 도 1: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 SK-MEL-28의 민감도.
- 도 1: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 SK-MEL-28의 민감도.
- 도 2: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 SKBR3의 민감도.
- 도 3: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 PaCa2의 민감도.
- 도 4: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 PC-3의 민감도.
- 도 5: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 HepG2의 민감도.
- 도 6: 초기 및 후기 사멸세포의 양에 의해 측정되는 Q10 처리후 24시간째에서의 MCF-7의 민감도.
- 도 7: 아포스트랜드 ELISA 방법에 의해 측정되는, Q10으로 24시간 처리한 후, 사멸세포의 측정.
- 도 8: 2-D 젤 전기영동로의 예시적 젤 분석. 검출용 스팟은 표시되어있음.
- 도 9: SK-MEL-28 세포에서, Q10에 의해 조절됨으로써 2-D 젤 전기영동에 의해 검출된 단백질 사이의 상호결합

네트워크.

- 도 10: Verhoeven et al. (Am. J. Hum. Genet. 2001 68(5):1086-1092)로부터 적용되는 펜토오즈 포스페이트 경로.
- 도 11: SK-MEL-28 세포의 미토콘드리아 풍부 물질의 2-D 젤. 질량분석기(mass spectrometry) 특성에 의해 표시되고 검출된 스팟은 표시되어 있음.
- 도 12: 100  $\mu$ M의 Q10을 배양액에 외생적으로 첨가함에 따른, SK-MEL-28 세포 미토콘드리아에 존재하는 Q10의 상대적 양의 비교 그래프.
- 도 13: 알려진 과정을 맵핑한 아포토시스 경로.
- 도 14: Bcl-1의 웨스턴 블랏 분석.
- 도 15: 비멘틴 항체로 증명되는 SK-MEL-28 샘플 세트의 웨스턴 블랏 분석.
- 도 16: 산화적 인산화 복합체(oxidative phosphorylation complexes (MitoSciences #MS601))를 표적화하는 다섯 개 항체로 평가되는, 다수 세포주로부터 세포 용해의 웨스턴 블랏 분석.
- 도 17: F1-알파 수준의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 18: C-III-Core 2와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 19: C-II-30와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 20: C-IV-COX II 와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 21: C-I-20 (ND6)와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 22: 다섯 개 미토콘드리아 단백질에 대항하는 다양한 세포형의 웨스턴 블랏 분석.
- 도 23: 복합체 V 단백질 C-V- $\alpha$ 와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 24: C-III-Core 1과 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 25: 포린(Porin, VDAC1)과 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 26: 사이클로필린 D와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 27: 사이토크롬 C와 Q10 반응의 웨스턴 블랏 비교.
- 도 28: 헬릭스(Helix) 10 열린 형태에서 HNF4알파 (1M7W.pdb)의 지질 결합 채널로 삽입되는 Q10(구)의 이론적 모델.
- 도 29: 침투 증진제를 갖는 본 발명의 개시된 조성물로 처리한 후 수컷 돼지에서의 상피 CoQ10 농도를 나타낸 그래프.
- 도 30: 대조군 조성물로 처리한 후 암컷 돼지에서의 상피 CoQ10 농도를 나타낸 그래프.
- 도 31: 전-처리된 표적 부위 1을 나타낸 사진.
- 도 32: 후-처리된 표적 부위 1을 나타낸 사진.
- 도 33: 전-처리된 표적 부위 2를 나타낸 사진.
- 도 34: 후-처리된 표적 부위 2를 나타낸 사진.
- 도 35: 전-처리된 표적 부위 3을 나타낸 사진.
- 도 36: 후-처리된 표적 부위 3을 나타낸 사진.
- 도 37: 정상산소 및 산소결핍 상태에서 다양한 글루코스 상태에 있어서의 HDFa 세포의 OCR.
- 도 38: 정상산소 및 산소결핍 상태에서 다양한 글루코스 상태에 있어서의 HASMC 세포의 OCR.
- 도 39: CoQ10 및 스트레스인자의 부존재 및 존재하에서의 MCF-7 유방암 세포의 OCR 값.

도 40: CoQ10 및 스트레스인자의 부존재 및 존재하에서의 PaCa-2 췌장암 세포의 OCR 값.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**I. 정의**

여기 사용된 바와 같이, 하기 각 용어는 이번 부분에서 이와 관련된 의미를 갖는다.

여기에서 "a" 및 "an"은 하나 또는 하나 이상의 (즉, 최소 1개)를 나타내는 문법적 목적을 갖는 용어이다. 예컨대 "구성요소"는 하나의 구성요소 또는 하나 이상의 구성요소를 의미한다.

"포함하는"이라는 용어는 여기에서 "제한되지 않으나, 포함되는"이라는 의미이며, 이와 상호변경가능하게 사용된다.

용어 "또는"은 만약 문맥에서 명백히 다르게 지적하지 않는 한 "및/또는"을 의미하며 이와 상호변경가능하게 사용된다.

용어 "예컨대"는 "제한되지 않으나, 예컨대"의 의미이며, 이와 상호변경가능하게 사용된다.

본 발명의 방법에 의해 치료되기 위한 "환자" 또는 "개체"는 인간 또는 비-인간 동물을 의미할 수 있고, 바람직하게는 포유류이다. 여기 기재된 임상 결과는 인간 개체에 대한 것이고, 최소 몇몇 실시양태에 있어서, 개체는 인간이라는 점을 염두에 두어야 한다.

"치료적 유효량"은 질환 치료를 위해 환자에 투여하였을 때 질환에 대한 치료 효과가 충분한 화합물의 양을 의미한다. 질환을 예방하기 위해 투여하였을 때, 질환의 발생을 늦추거나 피하는데 충분한 양을 의미한다. "치료적 유효량"은 화합물, 투여되는 개체의 질환 및 그 심각도 및 나이, 중량 등에 따라 달라질 것이다.

"예방하는" 또는 "예방"은 질환 또는 장애 (즉, 질환에 노출되거나 질환의 성향을 갖게 될 수 있으나 질환을 아직 경험하지 않았거나 질환의 증후를 나타내지 않는 환자에게 있어 질환이 발달하지 않도록 질환의 최소 하나의 임상 증후를 야기하는)가 일어나는 위험성을 감소시키는 것을 말한다.

"예방하는(prophylactic)" 또는 "치료적(therapeutic)" 처치라는 용어는 하나 또는 그 이상의 본 발명 조성물을 개체에 투여하는 것을 말한다. 만약 원치않는 상태의 임상적 증후에 앞서 투여되었다면 (예컨대 숙주동물의 질환 또는 기타 원치않는 상태), 그 처치는 예방적일 것이고, 즉 그것은 숙주에게 원치않는 상태로 발달하는 것을 막을 것이고, 반면 만약 원치않는 상태의 증후가 나타난 후 투여된다면, 그 처치는 치료적일 것이다(즉, 존재하는 원치않는 상태 또는 그로부터의 부작용을 감소, 완화 또는 유지시키는 것을 의도한다).

용어 "치료 효과"는 약학적으로 활성있는 물질에 의해 야기되는 동물, 특히 포유류 및 더욱 특이적으로는 인간에서의 국소 또는 전신 효과를 말한다. 상기 용어는 따라서 질환의 진단, 치유(cure), 완화, 치료 또는 예방에 사용되거나 동물 또는 바람직한 인간의 신체적 또는 정신적 발달 및 상태의 증진에 사용되는 것을 의도하는 임의의 물질을 의미한다. "치료적-유효량"이라는 용어는 임의의 처치에 사용되는 적정 이익/위험 비율에서 임의의 바람직한 국소 또는 전신 효과를 나타내는 물질의 양을 의미한다. 어떤 실시양태에서, 화합물의 치료적-유효량은 치료지수, 용해도 및 기타 등에 의존할 것이다. 예를 들면, 본 발명의 방법에 의해 발견된 어떤 화합물은 이러한 처치에 사용되는 적정 이익/위험 비율을 낮기 위하여 충분한 양으로 투여될 수 있다.

"환자"는 말, 개, 고양이, 돼지, 염소, 토끼, 햄스터, 원숭이, 기니아 피그, 랫트, 쥐, 도마뱀(lizards), 뱀, 양, 소, 물고기 및 새를 포함하는 임의의 동물(예컨대, 인간)을 의미한다.

"대사 경로"는 한 화합물이 다른 것으로 변형되어 세포 기능을 위한 중간체를 제공하고 에너지를 내는 효소-매개 반응의 과정을 말한다. 대사 경로는 선형 또는 사이클일 수 있다.

"대사 상태(metabolic state)"는 그들이 건강 또는 질병의 상태와 관련된 다양한 화학 및 생물학적 지표에 의한 측정되는, 주어진 시간 지점에서의 특정 세포성, 다중세포성 또는 조직 환경의 분자적 내용을 말한다.

"마이크로어레이"라는 용어는 기질, 예컨대 종이, 나일론 또는 기타 타입의 멤브레인, 필터, 칩, 유리 슬라이드 또는 임의의 다른 적절한 고체 지지체상에서 합성되는 구분되는 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리펩티드(예컨대 항체) 또는 펩티드에 대한 어레이를 말한다.

용어 "장애" 및 "질환"은 신체의 임의의 부분, 기관 또는 시스템(또는 이들의 임의의 조합)의 정상 구조 또는 기능으로부터의 임의의 이탈을 말하며 이들을 포함하는 의미로 사용된다. 특정 질환은 생물학적, 화학적 및 물

리적 변화를 포함하여 특징적 증상 및 증후에 의해 표명되며, 이로 제한되지는 않으나 인구, 환경, 고용, 유전 및 의학적 히스토리와 같은 요인들을 포함하는 보통 다양한 다른 인자들과 연관된다. 임의의 특징적 증후, 증상 및 관련 요인들

- [0069] 용어 "발현"은 DNA로부터 폴리펩티드를 얻는 과정을 의미하는 것으로 여기에서 사용된다. 상기 과정은 유전자로부터 mRNA로의 전사 및 이 mRNA로부터 폴리펩티드로의 번역을 포함한다. 문맥에 따라, "발현"은 RNA, 단백질 또는 둘 다의 생성을 말할 수 있다.
- [0070] 용어 "유전자의 발현 수준" 또는 "유전자 발현 수준"은 pre-mRNA 초기 전사, 전사 프로세싱 중간체, 성숙 mRNA 및 분해산물 뿐만 아니라 mRNA의 수준, 또는 세포에서 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 수준을 말한다.
- [0071] 용어 "조절(modulation)"은 반응의 상향조절(즉, 활성화 또는 촉진), 하향조절(즉, 저해 또는 억제) 또는 이들의 조합 또는 각각을 말한다. "조절제"는 조절하는 화합물 또는 분자이며, 예컨대 작용제, 길항제, 활성화제, 촉진제, 억제제, 또는 저해제일 수 있다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "트롤라민"은 트롤라민 NF, 트리에탄올아민, TEAlan®, TEAlan 99%, 트리에탄올아민, 99%, 트리에탄올아민, NF 또는 트리에탄올아민, 99%, NF를 언급한다. 이들 용어는 본원에 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0073] 여기에 사용된 용어 "조효소 생합성 경로의 대사체"는 티로신 및 아세틸-CoA의 유비퀴논으로의 화학적/생물학적 변환 사이에서 형성되는 화합물들을 특징으로 한다. 조효소 생합성 경로의 대사체는 3-헥사프레닐-4-히드록시벤조에이트, 3-헥사프레닐-4,5-디히드록시벤조에이트, 3-헥사프레닐-4-히드록시-5-메톡시벤조에이트, 2-헥사프레닐-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-헥사프레닐-3-메틸-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-헥사프레닐-3-메틸-5-히드록시-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 3-옥타프레닐-4-히드록시벤조에이트, 2-옥타프레닐페놀, 2-옥타프레닐-6-메톡시페놀, 2-옥타프레닐-3-메틸-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-옥타프레닐-3-메틸-5-히드록시-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-데카프레닐-3-메틸-5-히드록시-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-데카프레닐-3-메틸-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-데카프레닐-6-메톡시-1,4-벤조퀴논, 2-데카프레닐-6-메톡시페놀, 3-데카프레닐-4-히드록시-5-메톡시벤조에이트, 3-데카프레닐-4,5-디히드록시벤조에이트, 3-데카프레닐-4-히드록시벤조에이트, 4-히드록시 페닐피루베이트, 4-히드록시페닐젓산, 4-히드록시-벤조에이트, 4-히드록시신나메이트 및 헥사프레닐디포스페이트를 포함한다.
- [0074] 참고문헌이 이제 본 발명의 바람직한 실시양태에서 상세히 만들어질 것이다. 본 발명이 바람직한 실시양태와 함께 설명되지만, 바람직한 실시양태로 본 발명을 제한하는 것을 의도하지 않는 것으로 이해될 것이다. 반대로, 그것은 첨부된 청구항으로 정의되는 본 발명의 정신 및 범위내에 포함될 수 있는 것으로서의 변형, 조절 및 등가물을 커버하는 것을 의도한다.

[0075] **II. 환경 영향인자**

- [0076] 본 발명은 환경 영향인자의 투여에 의해 종양학적 장애를 치료하는 방법을 제공한다. "환경 영향인자"(Env-영향인자)는 이로운 방식으로 사람의 질환 환경에 영향을 주거나 조절하여 사람 질환 환경이 전환되도록 하여 정상 또는 건강한 환경으로 복귀하거나 유지시켜 정상 상태를 유도하는 분자이다. Env-영향인자는 하기 정의된 바와 같이 다차원 세포내 분자(MIM) 및 환경대사 전환인자(Epi-전환인자) 둘 모두를 포함한다.
- [0077] 여기에 사용된 바와 같은 "종양학적 장애"는 인간에서 발견되는 모든 종류의 암 또는 종양 또는 악성 종양을 말하며, 이로 제한되는 것은 아니나 백혈병, 림프종, 흑색종, 상피성암(carcinomas) 및 육종(sarcomas)을 포함한다. 여기에 사용된 바와 같은 "종양학적 장애," "암," "종양(neoplasm)," 및 "종양(tumor)"은 상호교환가능하고, 단수 또는 복수형으로 사용되며, 숙주 기관에서 병을 일으키는, 악성 변형이 된 세포를 말한다. 어떤 실시양태에서, 종양학적 장애는 조효소 Q10 반응성 상태이다.
- [0078] 어떤 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 아포토시스의 부족에 의해 특징지워진다. 다른 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 신생혈관생성의 증대로 특징지워진다. 다른 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 분해에 의해 특징지워진다. 또 다른 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 세포 주기 컨트롤의 손실에 의해 특징지워진다. 또 다른 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 미토콘드리아의 산화적 인산화로부터 젓산 및 해당과정의 플럭스에 대한 이용 및/또는 의존성이 증진되는 것으로서의 대사 체계에 있어서의 쉬프트에 의해 특징지워진다. 또 다른 실시양태에서 종양학적 장애 또는 암은 면역감시를 피하는 면역조정 메커니즘에 적용되는 것으로 특징지워진다. 일 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 최소 두 개의 상기 특징, 예컨대 증가된 신생혈관생성 및 ECM 분해에 의해 특징지워진다. 일 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 최소 3가지의 상기 특징들로 특징지워진다. 일 실시양태에서, 종양학적 장애 또는 암은 최소 네 가지

의 상기 특징들로 특징지어진다. 일 실시양태에서, 중앙학적 장애 또는 암은 최소 다섯 가지의 상기 특징들로 특징지어진다. 일 실시양태에서, 중앙학적 장애 또는 암은 최소 여섯 가지의 상기 모든 특징들로 특징지어진다.

[0079] 따라서, 어떤 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 세포사멸에 대한 능력을 회복하거나 세포사멸을 유도함으로써 기능한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 신생혈관생성을 감소, 억제 또는 저해함으로써 기능한다. 또 다른 실시양태에서 본 발명의 화합물은 세포외기질의 재-확립화를 회복시킴으로써 기능한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 세포주기 컨트롤을 회복함으로써 기능한다. 또 다른 실시양태에서 본 발명의 화합물은 해당과정으로부터 미토콘드리아 산화적 인산화로 대사 체계를 역 쉬프팅함으로써 기능한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 암 세포를 외부인자(foreign)로 인지하는 신체 능력을 회복하거나 면역-감시능을 회복함으로써 기능한다.

[0080] 임의의 특정 이론에 구속되지 않고, 이는 암으로 발달하기 위하여 종합되는 전형적으로 조직화되는 캐스케이드라고 여겨진다. 즉, 어떤 실시양태에서, 암은 1 유전자-1 단백질-루트 인과관계에 특이하게 의존하지 않는다. 어떤 실시양태에서, 암은 중앙으로 되는 조직 변화 및 변형, 변형된 조직 상태, 예컨대 전이적 잠재성, 면역감시의 결핍 및/또는 혈관형성의 변형된 상태로 되는, 에너지가 소요되며, 면역반응이 손상된 세포의 매트릭스 통합(integrity) 상태로 나타내지는 생리학적 질환 상태이다.

[0081] 1차 암세포 (즉, 악성 변형 부위 근처로부터 수득된 세포)는 잘-확립된 기술, 특히 조직학적 시험으로 비-암화 세포와 쉽게 구별할 수 있다. 여기에서 사용되는 바와 같은, 암 세포의 정의는 1차 암 세포 뿐만 아니라 암 줄기 세포, 뿐만 아니라 암 전구체 세포(cancer progenitor cells) 또는 암 세포 조상으로부터 유래한 임의의 세포를 포함한다. 전이된 암 세포 및 시험관내 배양 및 암 세포로부터 유래한 세포주를 포함한다. 정상적으로 고형중앙으로 나타내지는 암의 종류를 말할 때, "임상적으로 검출가능한" 중앙은 종괴 기준으로 검출가능한 것이며; 예컨대 CAT 스캔, MR 영상화, X-선, 초음파 또는 촉진(palpation)에 의해 검출가능하며/하거나 환자로 부터 수득될 수 있는 샘플에서 하나 또는 그 이상의 암-특이적 항원이 발현함으로써 인하여 검출가능하다.

[0082] **1. 다차원 세포내 분자(MIM)**

[0083] 용어 "다차원 세포내 분자(MIM)"은 인간의 최소 하나의 세포에 존재하고/거나 신체에 의해 자연적으로 생성되는 내생 분자의 분리된 형태 또는 합성을 통해 생산된 형태이다. MIM은 하나 또는 그 이상의, 둘 또는 그 이상의, 셋 또는 그 이상의, 또는 하기 기능 모두에 의해 특징지어진다. MIM은 세포로 들어갈 수 있고, 분자의 생물학적으로 활성이 있는 부분이 모두 세포로 들어가는 한, 세포로의 도입은 세포내로의 완전한 또는 부분적 도입을 포함한다. MIM은 세포내에서 신호 전달 및/또는 유전자 발현 메커니즘을 유도할 수 있다. MIM은 분자가 치료적 및 담체, 예컨대 약물 전달, 효과 모두를 갖는 점에서 다차원적이다. MIM은 또한 분자가 질병 상태에서 한 방향으로 작용하고, 정상 상태에서 상이한 방향으로 작용하는 면에서 다차원적이다. 예를 들면, CoQ10의 경우, VEGF 존재하에 CoQ10을 흑색종 세포에 투여하면 Bcl2의 수준이 감소하게 되며, 결국 흑색종 세포에 대해서 중앙발생의 잠재력이 감소하게 된다. 반대로, 정상 섬유아세포에서, CoQ10 및 VEGF를 공동 투여하면 Bcl2 수준에 영향을 미치지 않는다. 바람직하게는, MIM은 질병 상태의 세포에 선택적으로 작용하고, 정상 상태의 (매칭) 세포에 실질적으로 영향을 주지 않는다. 바람직하게는, MIM은 표현형, 대사 상태, 유전형, mRNA/단백질 발현 수준 등에 있어서 질병 상태의 세포(매칭) 정상 상태 세포에 근접하게 만든다.

[0084] 일 실시양태에서, MIM은 환경대사적 전환 인자일 수도 있다. 또 다른 실시양태에서, MIM은 환경대사적 전환인자가 아니다. 기술자는 본 발명의 MIM이 두 개 또는 그 이상의 내생 분자의 혼합물을 포함하는 것을 의도한다는 점을 또한 이해할 것이며, 여기에서 혼합물은 하나 또는 그 이상의 앞서 언급한 기능에 의해 특징지어진다. 혼합물 중의 내생 분자는 혼합물이 MIM으로서 기능하는 비율로 존재한다.

[0085] MIM은 지질 기반 또는 비-지질 기반 분자일 수 있다. MIM의 예로는, 이로 제한되는 것은 아니나, CoQ10, 아세틸 Co-A, 팔미틸 Co-A, L-카르니틴, 아미노산, 예컨대 티로신, 페닐알라닌 및 시스테인을 포함한다. 일 실시양태에서, MIM은 소분자이다. 본 발명의 일 실시양태에서, MIM은 CoQ10이 아니다. MIM은 이 기술분야의 기술자가 여기에 상세히 기재된 임의의 분석방법을 사용하여 루틴하게 확인할 수 있다.

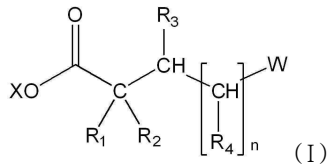
[0086] 어떤 실시양태에서, MIM은 비타민 B 패밀리의 화합물, 또는 비타민 B 패밀리의 화합물을 포함하는 뉴클레오사이드, 모노뉴클레오티드 또는 디뉴클레오티드를 포함한다. 비타민 B 패밀리의 화합물은, 예를 들면 티아민(비타민 B1), 니아신(티코틴 산 또는 비타민 B3로도 알려짐), 또는 피리독신(비타민 B6) 뿐만 아니라 프로비타민 예컨대 판테놀(프로비타민 B5)를 포함한다. 어떤 실시양태에서, MIM은 티아민, 니아신 및 피리독신으로부터 선택된다. 비타민 B 패밀리의 화합물을 포함하는 뉴클레오사이드, 모노뉴클레오티드 또는 디뉴클레오티드는 예를 들면, 아

데닌 또는 니아신(니코틴산) 분자를 포함하는 뉴클레오사이드, 모노뉴클레오티드 또는 디뉴클레오티드를 포함한다. 어떤 실시양태에서, MIM은 아데노신, 아데노신 디포스페이트(ADP), 플라빈 아데노신 디뉴클레오티드(FAD, 비타민 B2 및 ADP의 부분을 포함하는) 및 니코틴산 디뉴클레오티드로부터 선택된다.

[0087] 다른 실시양태에서, MIM은 아미노산을 포함한다. 아미노산의 예로는, 예컨대 티로신(예컨대 L-티로신), 시스테인, 페닐알라닌(예컨대 L-페닐알라닌) 및 알라닌을 포함한다. 어떤 실시양태에서, 아미노산은 페닐알라닌 또는 알라닌이다. 어떤 실시양태에서, MIM은 아미노산 유도체 예컨대 4-히드록시페닐피루베이트 또는 아세틸글리신을 포함한다.

[0088] 어떤 실시양태에서, MIM은 글루코스 아날로그이며, 예컨대 글루코스 분자에서 한 -OH 또는 -CH<sub>2</sub>OH 치환체가 -COOH, -COO<sup>-</sup> 또는 -NH<sub>2</sub> 치환체로 대체된 글루코스 분자이다. 글루코스 아날로그의 예로는 글루코사민, 글루쿠론산, 글루쿠로니드 및 글루쿠로네이트를 포함한다.

[0089] 어떤 실시양태에서, MIM은 화학식 (I)의 화합물로부터 선택된다:



[0090] 여기서,  
 [0091] n은 0 또는 1의 정수이고;

[0092] R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 만약 존재한다면, 각각 독립적으로 수소 및 히드록실로부터 선택되거나, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 이들이 부착된 탄소와 함께 카르보닐(C=O)기를 형성하며;

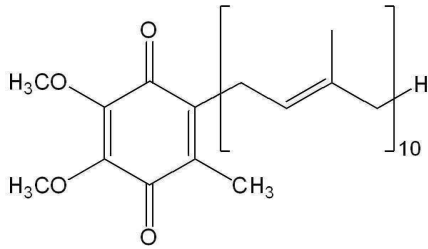
[0093] W는 -COOH 또는 -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>이고;  
 [0094] X는 수소이며, 음전하 또는 알칼리 금속 양이온, 예컨대 Na<sup>+</sup> 또는 이다.

[0095] n이 0일 때, CHR<sub>3</sub>기는 W 치환기에 결합되는 것으로 이해된다.  
 [0096] 어떤 실시양태에서, W는 -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>이다. 어떤 실시양태에서, MIM은 카르니틴, 예컨대 L-카르니틴이다.

[0097] 어떤 실시양태에서, MIM은 디카르복실산이다. 어떤 실시양태에서 W는 -COOH이다. 어떤 실시양태에서 R<sub>3</sub>은 수소이다. 어떤 실시양태에서 n은 0이다. 어떤 실시양태에서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소이다. 어떤 실시양태에서, W는 -COOH이고, R<sub>3</sub>은 수소이며, n은 0이고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소이다. 어떤 실시양태에서 n은 1이다. 어떤 실시양태에서 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 이들이 부착된 탄소와 함께 카르보닐(C=O)기를 형성한다. 어떤 실시양태에서, R<sub>4</sub>는 수소이다. 어떤 실시양태에서, R<sub>4</sub>는 히드록실이다. 어떤 실시양태에서, W는 -COOH이고, R<sub>3</sub>은 수소이며, n은 1이고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 이들이 부착된 탄소와 함께 카르보닐(C=O)기를 형성한다.

[0098] 어떤 실시양태에서, MIM은 크랩 사이클의 중간체이고, 과량은 크랩 사이클이 생산적인 산화적 인산화로 가도록 한다. MIM인 예시적 크랩 사이클 중간체로는 숙신산 또는 숙시네이트, 말산 또는 말레이트 및 α-케토글루타르산 또는 α-케토글루타레이트를 포함한다.

[0100] 어떤 실시양태에서, MIM은 CoQ10의 빌딩 블록(building block)이며, 하기 구조를 갖는다:



[0101]

[0102] 따라서, CoQ10의 빌딩 블록은 이로 제한되는 것은 아니나, 페닐알라닌, 티로신, 4-히드록시페닐피루베이트, 페닐아세테이트, 3-메톡시-4-히드록시만델레이트, 바닐산, 4-히드록시벤조에이트, 메발론산, 파네실, 2,3-디메톡시-5-메틸-p-벤조퀴논, 뿐만 아니라 이들의 상응하는 산 또는 이온을 포함한다. 어떤 구체예에서, MIM은 페닐알라닌, 티로신, 4-히드록시페닐피루베이트, 페닐아세테이트 및 4-히드록시벤조에이트로부터 선택된다.

[0103] **2. 환경대사적 전환인자(Epimetabolic Shifters, 환경대사적 전환인자)**

[0104] 여기 사용된 바와 같은 "환경대사적 전환인자"(epi-전환인자)는 건강(또는 정상) 상태에서부터 질병이 있는 상태로의 대사 변환 및 그 반대를 조절하는 (내생적 또는 외생적) 분자이며, 그림으로써 인간의 세포성, 조직, 기관, 시스템 및/또는 숙주 건강을 유지 또는 재확립할 수 있다. epi-전환인자는 조직 미세환경의 정상화를 유발할 수 있다. 예를 들면, epi-전환인자는 세포에 첨가되거나 세포로부터 고갈될 때, 세포의 미세환경(예컨대 대사 상태)에 영향을 줄 수 있는 임의의 분자를 포함한다. 기술자는 본 발명의 epi-전환인자가 두 개 또는 그 이상의 분자의 혼합물을 포함하는 것을 또한 의도한다는 점을 이해할 것이며, 여기에서 혼합물은 앞서 언급한 하나 또는 그 이상의 기능에 의해 특징지어진다. 혼합물에 있어서 분자는 혼합물이 epi-전환인자로 기능하는 비율로 존재한다. epi-전환인자의 예로는, 이로 제한되는 것은 아니나 CoQ10; 비타민 D3; ECM 구성요소 예컨대 피브로넥틴; 면역조절자, 예컨대 TNF α 또는 임의의 인터루킨, 예컨대 IL-5, IL-12, IL-23; 신생혈관생성 인자(angiogenic factors); 및 아포토시스 인자를 포함한다.

[0105] 어떤 실시양태에서, epi-전환인자는 예컨대 크렙 사이클에서 하나 또는 그 이상의 반응을 촉매하는데 직접적으로 참여하거나 과량인 경우 크렙 사이클로 가도록 만드는 크렙 사이클 대사체를 생성하는 효소와 같은 효소이다. 어떤 실시양태에서, 효소는 펜토오즈 포스페이트 경로, 예컨대 트랜스알돌라아제, 또는 트랜스케톨라아제의 비-산화 상(non-oxidative phase)의 효소이다. 다른 실시양태에서, 효소는 크렙 사이클을 촉진하는 구성 성분 효소 또는 효소 복합체이며, 예컨대 합성효소 또는 리가아제이다. 예시적 효소로는 숙시닐 CoA 합성효소(크렙 사이클 효소) 또는 피루베이트 카르복실라아제(피루베이트의 가역적 카르복실화를 촉매하여 올살로아세테이트(OAA), 크렙 사이클의 대사체를 형성하는 리가아제)를 포함한다.

[0106] 어떤 실시양태에서, epi-전환인자는 CoQ10의 빌딩 블록이다. CoQ10의 빌딩 블록은, 이로 제한되는 것은 아니나, 페닐알라닌, 티로신, 4-히드록시페닐피루베이트, 페닐아세테이트, 3-메톡시-4-히드록시만델레이트, 바닐산, 4-히드록시벤조에이트, 메발론산, 파네실, 2,3-디메톡시-5-메틸-p-벤조퀴논, 뿐만 아니라 이들의 상응하는 산 또는 이온을 포함한다. 어떤 실시양태에서, epi-전환인자는 페닐알라닌, 티로신, 4-히드록시페닐피루베이트, 페닐아세테이트 및 4-히드록시벤조에이트로부터 선택된다.

[0107] 어떤 실시양태에서, epi-전환인자는 비타민 B 패밀리의 화합물이다. 비타민 B 패밀리의 화합물로는, 예를 들면 리보플라빈(비타민 B2), 또는 이들의 아날로그를 포함한다. epi-전환인자는 또한 임의의 아날로그 또는 프로-드럭을 포함하는데, 이들은 생체내에서 여기 기재된 것과 같은 임의의 내생적 MIM으로 대사될 수 있다.

[0108] 일 실시양태에서, epi-전환인자는 또한 MIM이다. 일 실시양태에서, epi-전환인자는 CoQ10이 아니다. epi-전환인자는 이 기술분야의 기술자에 의해 여기 상세히 기재된 임의의 분석방법을 사용하여 루틴하게 확인될 수 있다.

[0109] 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 MIM 또는 환경전환인자를 사용하여 이를 필요로 하는 피검체에서 조효소 Q10 반응성 상태를 치료할 수 있다. 용어 "조효소 Q10 반응성 상태" 또는 "CoQ10 반응성 상태"는 조효소 Q10의 투여에 의해 치료되거나 예방되거나 다르게 개선될 수 있는 질환, 장애, 상태 및/또는 병태를 포함한다. 임의의 특정 이론에 국한되는 것 없이 본원에 추가로 기재된 바와 같이, CoQ10은 적어도 부분적으로 세포 미세환경으로 대사적 전환(예를 들어, 정상 상태 세포에서의 산화성 인산화 유형 및/또는 수준으로의 전환)을 유도함에 의해 기능하는 것으로 사료된다. 따라서, 몇몇 양태에서, CoQ10 반응성 상태는 세포 미세환경의 변화된 대사로부터 유래된 상태이다. 조효소 Q10 반응성 상태는 예를 들어, 예를 들어,

해당과정 및 젓산 생합성으로 치우칠 수 있는 중앙학적 장애를 포함한다. 몇몇 양태에서, CoQ10 반응성 장애는 무엇보다 간암, 췌장암, 유방암, 전립선 암, 간암 또는 골암, 편평상피세포암종, 기저세포 암종, 흑색종 및 광선각화증을 포함한다. 조효소 Q10 반응성 상태는 본원에 기재된 바와 같은 다른 중앙학적 장애를 추가로 포함한다.

[0110] 조효소 Q10 반응성 상태는 또한 예를 들어, 비만, 당뇨병, 전당뇨병(pre-diabetes), 대사적 증후군, 포만감 및 내분비 이상증과 같은 대사적 장애를 포함한다. 조효소 Q10 반응성 상태는 본원에 기재된 바와 같은 다른 대사적 장애를 추가로 포함한다.

[0111] 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 MIM 또는 환경-전환인자는 조효소 Q10 과 공통된 활성을 공유한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조효소 Q10과 공통된 활성을 공유하는"은 조효소 Q10과 동일하거나 유사한 활성 중 적어도 일부를 나타내는 화합물의 능력을 언급한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물은 조효소 Q10의 25%이상의 활성을 나타낸다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물은 조효소 Q10의 약 130% 까지 및 이를 포함하는 활성을 나타낸다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물은 조효소 Q10의 약 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, 116%, 117%, 118%, 119%, 120%, 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 126%, 127%, 128%, 129%, 또는 130%의 활성을 나타낸다. 상기 문단에 열거된 각각의 수치는 용어 "약"에 의해 변경될 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 추가로, 상기 문단에 열거된 임의의 2개의 수치에 의해 정의된 임의의 범위는 본 발명에 의해 포함됨을 의미하는 것으로 이해되어야만 한다. 예를 들어, 몇몇 양태에서, 본 발명의 화합물은 조효소 Q10의 약 50% 내지 약 100%의 활성을 나타낸다. 몇몇 양태에서, 조효소 Q10 및 본 발명의 화합물에 의해 공유되는 활성은 세포 대사에서 전환을 유도하는 능력이다. 특정 양태에서, CoQ10 및 본 발명의 화합물에 의해 공유된 활성은 OCR(산소 소비율) 및/또는 ECAR(세포의 산성화율)에 의해 측정된다.

[0112] **III. MIM/Epi-전환인자를 확인하기에 유용한 시험법**

[0113] 관심있는 분자 및 화합물을 분리하고 확인하기 위해 사용된 본 발명의 기술과 방법은 액체 크로마토그래피(LC), 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 질량 분석법(MS), 가스 크로마토그래피(GC), 액체 크로마토그래피/질량 분석법(LC-MS), 가스 크로마토그래피/질량 분석법(GC-MS), 핵자기 공명법(NMR), 자기공명 이미지(MRI), 푸리에 트랜스폼 적외선법(FT-IR) 및 유도 결합 플라즈마 분석기(ICP-MS)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 질량 분석 기술은 자기 선택 및 이중 초점 기기, 4중 극자 투과 기기, 4중 극자 이온-트랩 기기, 비행-시간 기기(TOF), 푸리에 트랜스폼 이온 사이클로트론 공명 기기(FT-MS) 및 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 비행-시간 질량 분석기(MALDI-TOF MS)의 사용을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] 생체에너지 분자 수준의 정량화

[0115] 환경 영향 인자(예를 들면, MIM 또는 Epi-전환인자)는 후보 epi-전환인자가 적용되었을 때, 세포의 세포내 생체 에너지 분자(예를 들면, ATP, 피루베이트, ADP, NADH, NAD, NADPH, NADP, 아세틸CoA, FADH2)의 수준 변화에 의해 확인될 수 있다. 생체에너지 분자 수준의 예시화된 시험법으로 발색, 형광 및/또는 생체인광(bioluminescent)에 기반한 방법을 사용한다. 그러한 시험법의 예는 하기에 제공된다.

[0116] 세포내 ATP의 수준은 다양한 시험법 및 공지의 시스템에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 한 시스템에서 용해된 세포로부터 나오는 세포질 ATP은 루시페린과 효소 루시페라제와 반응하여 빛을 생산한다. 이러한 생체 인광은 생체인광분석기에 의해 측정되며, 용해된 세포의 세포내 ATP 농도는 계산될 수 있다 (EnzyLight™ ATP Assay Kit (EATP-100), BioAssay Systems, Hayward, CA). 또 다른 시스템에서, 예를 들어, ATP와 이의 탈인산화된 형태인 ADP 모두는 생체 인광법에 의해 계산될 수 있는데; ATP 수준이 계산된 후에, ADP는 ATP로 변환되고 이후 검출되며 동일한 루시페라제 시스템(ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit, BioVision Inc., Mountain View, CA)을 사용하여 계산된다.

[0117] 피루베이트는 세포내 대사 경로에서 중요한 중간체이다. 피루베이트는 글루코스신생합성(glucogenesis)을 거쳐 탄수화물로 변환될 수 있으며, 세포내 대사 상태에 의존하여, 지질산으로 변환되거나 아세틸 CoA를 거쳐 대사되거나 또는 알라닌 또는 에탄올로 변환된다. 따라서, 피루베이트 수준의 검출은 세포 표본의 대사 활성과 상태 측정에 제공된다. 피루베이트를 검출하는 하나의 시험법은, 예를 들면, 발색 및 형광 모두를 사용하여 다른 범



위 내의 피루베이트 농도를 검출하는 것(EnzyChrom™ 피루베이트 분석 키트 (Cat# EPYR-100), BioAssay Systems, Hayward, CA)이다.

[0118] 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 세포내 미토콘드리아에 의해 수행되는, 세포내 생체에너지 분자의 생성 및 유지와 관련된 산화적 인산화 과정에 영향을 줄 수 있다. 세포 배양물 및 표본에서 직접적으로 세포 에너지의 변화를 검출하는 시험법(이하 기술)에 더하여, 세포내 미토콘드리아 복합체와 효소에 별개로 미치는 화합물의 영향을 검출하고 정량화하는 시험법이 존재한다. 예를 들어, MT-OXC MitoTox™ 완전 OXPHOS 활성 시험법 (MitoSciences Inc., Eugene, OR) 은 미토콘드리아로부터 추출된 복합체 I 내지 V에 직접적으로 적용된 화합물의 영향을 검출하고 정량화할 수 있다. NADH 데하이드로게나제(복합체 I), 시토크롬 c 산화효소(복합체 IV) 및 ATP 합성효소(복합체 V)와 같은 개별적인 미토콘드리아 복합체에 미치는 영향의 검출 및 정량화를 위한 시험법이 또한 활용될 수 있다 (MitoSciences Inc., Eugene, OR).

[0119] 세포 에너지의 측정

[0120] 환경 전환인자(예를 들면, MIM 또는 Epi-전환인자)는 또한 세포 에너지의 변화에 의해 확인될 수 있다. 세포 에너지 측정의 한 예는 분자성 산소의 소비 및/또는 세포 배양 배지의 pH 변화를 실시간으로 측정하는 것이다. 예를 들어, 잠재적인 epi-전환인자가 세포의 대사 상태를 조절하는 능력은 예를 들면, XF24 분석기(Seahorse, Inc.)을 사용하여 분석될 수 있다. 이러한 기술은 세포 미소환경의 생체 에너지를 평가하기 위하여, 세포 단일 층 내 산소 및 pH 변화의 실시간 검출을 허용한다. XF24 분석기는 세포 에너지에 있어 주요 지시자에 해당하는, 호기성 대사의 측정값인 산소 소비율(OCR)과 당분해의 측정값인 세포의 산성화(ECAR) 모두를 측정하고 비교한다.

[0121] 산화적 인산화와 미토콘드리아 기능의 측정

[0122] 산화적 인산화는 미토콘드리아 막 내 묻혀진 단백질 복합체를 거쳐 진행 세포내에서 수행되는 영양 화합물의 산화를 거쳐 ATP가 생성되는 과정이다. 대부분의 유기체의 세포내에서 ATP의 주요 원천으로서, 산화적 인산화 활성의 변화는 강력하게 세포내 대사 및 에너지 균형을 변화시킬 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 산화적 인산화에 대한 이들의 영향에 의해 검출되고/되거나 확인될 수 있다. 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 이에 제한되는 것은 아니나, 전자 전달 사슬 및 ATP 합성을 포함하는 산화적 인산화의 구체적인 측면에 대한 이들의 영향을 검출되거/되거나 확인될 수 있다.

[0123] 산화적 인산화와 관련된 과정을 수행하는 미토콘드리아의 막 내 단백질 복합체는 특별한 작업을 수행하고, 이는 I, II, III 및 IV로 번호 붙여진다. 이들 복합체는 트래스-내부 막 ATP 합성효소(복합체 V로 알려짐)를 따르는, 산화적 인산화 과정과 관련된 주요 대상(entity)이다. 일반적으로 미토콘드리아 기능, 특히 산화적 인산화 과정에 미치는 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)의 효과를 조사할 수 있는 시험법에 추가하여, 다른 복합체로부터 분리되어 개별적인 복합체에 epi-전환인자가 미치는 영향을 조사하는데 사용될 수 있는 시험법이 활용될 수 있다.

[0124] NADH-조효소 Q 옥시도리덕타제 또는 NDAH 데하이드로게나제로서 알려진 복합체 I은 전자 전달 사슬 내에서의 첫 번째 단백질이다. 일부 구체예에서, 복합체 I에 의한 NAD<sup>+</sup> 생산에 있어 epi-전환인자가 미치는 영향의 검출 및 정량화가 수행될 수 있다. 예를 들어, 복합체는 96-웰 플레이트에서 표본으로부터 면역포획될 수 있고; NADH에서 NAD<sup>+</sup>로의 산화는 450 nM에서의 증가된 흡수를 나타내는 염색 분자의 환원과 함께 동시에 일어난다(복합체 I 효소 활성 마이크로플레이트 시험 키트, MitoSciences Inc., Eugene, OR).

[0125] 시토크롬 c 산화효소(COX)로 알려진 복합체 IV는 전자 전달 사슬에서 마지막 단백질이다. 일부 구체예에서, 복합체 IV에 의한 시토크롬 c의 산화와 산소에서 물로의 환원에 미치는 epi-전환인자의 효과 검출 및 정량화가 수행될 수 있다. 예를 들어, COX는 마이크로웰 플레이트에서 면역포획되어 COX의 산화는 발색 시험법으로 측정된다 (복합체 IV 효소 활성 마이크로플레이트 시험 키트, MitoSciences Inc., Eugene, OR).

[0126] 산화적 인산화 과정에서의 첫 번째 효소는 ATP 합성효소(복합체 V)로, 다른 복합체에 의해 생성된 양성자 구배를 사용하여 ATP를 ADP로 합성하는 동력으로 한다. 일부 구체예에서, ATP 합성효소의 활성에 미치는 epi-전환인자의 효과 검출 및 정량화가 수행될 수 있다. 예를 들어, 표본 내에 ATP 합성 효소의 활성과 ATP 합성 효소의 양은 마이크로웰 플레이트의 웰 내 면역포획된 ATP 합성 효소에 의해 측정될 수 있다. 효소는 또한 어떤 특정 조건에서 ATP아체로서 기능할 수도 있으며, 따라서 ATP 합성효소 활성에 대한 시험법에서, ATP를 ADP로 환원하

는 비율은 NADH를 NAD+로 산화하는 것을 동시에 검출함으로써 측정된다. ATP의 함량은 ATP아제 에 표식화된 항체를 사용하여 계산된다(ATP 합성효소 Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit, MitoSciences Inc., Eugene, OR). 산화적 인산화를 위한 추가적인 시험법은 복합체 II 및 III의 활성에 미치는 영향을 시험하는 시험법을 포함한다. 예를 들면, MT-OXC MitoTox™ Complete OXPHOS System (MitoSciences Inc., Eugene, OR)은 복합체 I, IV 및 V 뿐만 아니라 복합체 II 및 III에 화합물이 미치는 영향을 평가하는데 사용될 수 있고, 전체적인 산화적 인산화 시스템에 화합물이 미치는 영향에 대한 데이터를 제공한다.

[0127] 상기 기술한 바와 같이, 온전한 세포 표본의 실시간 관찰은 세포 배양 배지 내 산소 소비 및 pH의 변화에 대한 탐침기를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 세포 에너지의 시험법은 미토콘드리아 기능 및 잠재적인 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)가 표본 세포내 미토콘드리아 활성에 미치는 영향에 대한 광범위한 개요를 제공한다.

[0128] 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 또한 미토콘드리아 투과성 전이(MPT), 즉, 미토콘드리아 투과 전이 공극(MPTP)의 형성에 의해 미토콘드리아 막의 투과성이 향상되는 현상에 영향을 미칠 수 있다. 미토콘드리아 투과성의 향상은 미토콘드리아가 부풀어 오르게 하며(swelling), 산화적 인산화 및 ATP 재생을 어렵게 하고 결국 세포사로 이끈다. MPT는 세포 사멸 유도과 관련될 수 있다 (참조, 예를 들어 본원에서 전체가 참조로서 도입되는 Halestrap, A.P., Biochem. Soc. Trans. 34:232-237 (2006) 및 Lena, A. *et al.* Journal of Translational Med. 7:13-26 (2009))

[0129] 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)가 MPT 및 MPTP의 형성, 중단 및/또는 효과에 미치는 영향의 검출 및 정량화가 측정될 수 있다. 예를 들어, 시험법은 미토콘드리아 내부 막과 다른 시토졸 구획(compartment)을 구분시키는 구체적인 염료 분자(칼세인)의 사용을 통해 MPT를 측정할 수 있다. 또 다른 분자, CoCl<sub>2</sub>의 적용은 시토졸 내 칼세인 염료의 형광을 억누르는(squelch) 역할을 한다. 그러나 CoCl<sub>2</sub>는, 미토콘드리아의 내부에 접촉하지는 못하므로 따라서, 미토콘드리아 내 칼세인 형광은 MPT가 일어나고 CoCl<sub>2</sub>가 MPTP를 거쳐 미토콘드리아 내부로 접촉하지 않는 한, 억눌러지지 않는다. 미토콘드리아-특정 형광의 손실은 MPT가 일어날 때, 표시된다. 유동세포 분석법(Flow cytometry)이 세포 및 세포 기관 형광을 평가하는데 사용될 수 있다 ((MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit, Molecular Probes, Eugene, OR). 실험적인 결과를 평가하기 위하여, 추가적인 시험법은 형광 현미경을 사용한다(Image-iT™ LIVE Mitochondrial Transition Pore Assay Kit, Molecular Probes, Eugene, OR).

[0130] 세포 증식 및 염증 측정

[0131] 본 발명의 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 세포 증식 및/또는 염증과 관련된 분자의 생산 또는 활성에 미치는 효과에 의해 확인되고 평가된다. 이들 분자는 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 세포 외 매트릭스 성분, 케포카인, 뉴로펩타이드, 뉴로트랜스미터, 뉴로트로핀 및 신호 전달과 관련되는 것들과 같은 세포내 분자 뿐만 아니라 세포 신호와 관련되는 기타 분자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0132] 혈관내피 성장인자(VEGF)는 잠재적인 혈관신생, 혈관형성(vasculogenic) 및 분열촉진(mitogenic) 특성을 갖는 성장 인자이다. VEGF는 내피 투과성 및 스웰링을 자극하며 VEGF 활성은 류마티스 관절염, 전이성 암, 노인 황반 변성 및 당뇨병망막병증을 포함하는 다양한 질병 및 장애와 연루된다.

[0133] 본 발명의 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 그것이 VEGF의 생산에 미치는 영향에 의해 확인되고 특징지어진다. 예를 들어, 혈중 산소 감소 조건 또는 산성증 유사 조건 하에서 유지되는 세포는 증가된 VEGF 생산을 나타낼 것이다. 배지로 유출되는 VEGF는 활용가능한 항-VEGF 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하는 ELISA 또는 다른 항체-기반 시험법에 의해 시험될 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, Epi-전환인자는 그것이 VEGF에 대한 세포 반응성에 미치는 영향에 기반하고/하거나, VEGF 수용체의 발현 또는 활성에 미치는 영향에 기반하여 확인되고/되거나 특징지어진다.

[0134] 자가 면역 질환 뿐만 아니라 건강한 면역 시스템 기능 둘 다에 연루되어, 중앙 피사 인자(TNF)는 염증과 면역 시스템 활성의 주요 매개체이다. 본 발명의 일부 구체예에서, Epi-전환인자는 그것이 TNF의 생산 또는 활성에 미치는 영향에 의해 확인되고 특징지어질 수 있다. 예를 들어, 배양된 세포에 의해 생산되고 배지로 유출되는 TNF는 ELISA 또는 당업계에 알려진 다른 항체-기반 시험법을 거쳐 정량화될 수 있다. 또한 일부 구체예에서, 환경 영향 인자는 그것이 TNF에 대한 수용체 발현에 미치는 영향에 의해 확인되고 특징지어 질 수 있다 (Human

TNF RI Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN).

- [0135] 세포외 매트릭스 성분(ECM)은 세포와 조직의 구조 및 신호 전달 과정 모두에 있어 역할을 수행할 수 있다. 예를 들어, 잠복성 형질 전환 성장 인자 베타 결합 단백질은 ECM 성분으로, 이는 ECM과 함께 형질 전환 성장 인자 베타(TGF $\beta$ )의 저장소를 생성한다. 매트릭스-결합된 TGF $\beta$ 는 이후에 매트릭스 리모델링 과정 동안 방출될 수 있고, 근처의 세포에 성장 인자 효과를 발휘할 수 있다 (Dallas, S. *Methods in Mol. Biol.* 139:231-243 (2000)).
- [0136] 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 그것이 배양 세포에 의한 ECM 생성에 미치는 영향에 의해 확인되거나 특징지어진다. 연구자들은 지속적으로 기술을 개발하여, ECM의 조성 뿐만 아니라 세포에 의한 ECM 생성을 연구하고 정량화할 수 있었다. 예를 들어, 세포에 의한 ECM 합성은 배양 전에 하이드로겔 내에 세포를 묻음(embed)으로서 평가될 수 있다. 생화학 분석 및 기타 분석은 세포 수확 및 하이드로겔 소화 이후에 세포에 의해 생성되는 ECM에 대해 수행될 수 있다 (Strehin, I. and Elisseeff, J. *Methods in Mol. Bio.* 522:349-362 (2009)).
- [0137] 일부 구체예에서, 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 epi-환경 인자)가 유기체 내 ECM의 생산, 상태 또는 부족, 또는 그것의 성분 중 하나에 미치는 영향을 확인하거나 특징지을 수 있다. 조건부 녹-아웃(knock-out(KO))된 쥐가 개발되어 왔는데, 그 개발의 특정 단계 또는 별개의 세포 형태 내에서 단지 특히, ECM 유전자를 녹-아웃하는 것이 허용되었다 (Brancaccio, M. *et al.* *Methods in Mol Bio.* 522:15-50 (2009)). 특정 조직 내 특정 ECM 성분의 부재시 또는 개발의 특정 단계에서의 활성화에 대하여 epi-전환인자 또는 잠재적인 epi-전환인자를 적용 또는 투여한 효과가 따라서 평가되었다.
- [0138] 형질막 보존과 세포사의 측정
- [0139] 환경 영향 인자(예를 들어, MIM 또는 Epi-전환인자)는 세포 표본의 형질막 보존 변화 및/또는 세포 사멸, 괴사 또는 증가되거나 감소되는 세포사와 유사한 세포적 변화를 겪는 세포의 수 또는 백분율 변화에 의해 확인될 수 있다.
- [0140] 젖산 데하이드로게나제(LDH)에 대한 시험법은 세포 상태 및 손상 수준의 측정을 제공한다. LDH는 안정적이고 상대적으로 풍부한 세포질 효소이다. 형질막이 물리적 보존을 잃었을 때, LDH는 외부 구획으로 달아난다. 더 높은 LDH의 농도는 더 높은 형질막 손상 및 세포사의 수준과 연관성을 갖는다. LDH 시험법의 예는 표본 내에 LDH의 수준을 검출하고 정량화하는 발색 시스템을 사용하는 시험법을 포함하며, 여기서 테트라졸리움 염의 산화 형태는 LDH 효소의 활성을 거쳐 생산된다 (QuantiChrom™ Lactate Dehydrogenase Kit (LDH-100), BioAssay Systems, Hayward, CA; LDH Cytotoxicity Detection Kit, Clontech, Mountain View, CA).
- [0141] 세포 사멸은 다양하게 다른 개시 이벤트를 갖는 프로그램화된 세포사 과정이다. 다양한 시험법으로 세포 사멸을 겪는 세포의 수와 비율 변화를 측정할 수 있다. 세포 사멸을 검출하고 정량화하는데 사용되는 시험법의 한 형태는 카스파아제 시험법이다. 카스파아제는 세포 사멸 동안 단백질 가수 분해성 절단을 거쳐 활성화되는 아스파르트산-특정 시스테인 프로테아제이다. 활성화된 카스파아제를 검출하는 시험법의 예는 PhiPhiLux® (OncoImmunin, Inc., Gaithersburg, MD) 및 카스파아제-Glo® 3/7 Assay Systems (Promega Corp., Madison, WI)을 포함한다. 세포 사멸 및 비교 표본 내에 세포 사멸을 겪는 세포 백분율 또는 수 변화를 검출할 수 있는 추가적인 시험법은 TUNEL/DNA 절편 시험법을 포함한다. 이 시험법은 세포 사멸의 실행 시기 동안 뉴클리아제에 의해 생성되는 180 내지 200 염기쌍 DNA 절편을 검출한다. 예시적인 TUNEL/DNA 절편 시험법은 In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 및 the DeadEnd™ Colorimetric and Fluorometric TUNEL Systems (Promega Corp., Madison, WI)을 포함한다.
- [0142] 일부 세포 사멸 시험법은 세포 사멸성 및/또는 비-세포 사멸성 상태와 관련된 단백질을 검출하고 정량화한다. 예를 들어, MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega Corp., Madison, WI)은 단일 기질, 형광 검출 시스템을 사용하여, 살아있는 세포와 사멸한 세포에 특징적인 프로테아제를 검출하고 정량화하며, 그로 인해 세포 또는 조직 표본 내에 세포 사멸을 겪는 세포에 대한 살아있는 세포의 비율을 제공한다.
- [0143] 세포 사멸을 검출하고 정량화하는 데 활용될 수 있는 추가적인 시험법은 세포 투과율을 검출하는 시험법(예를 들어, APOPercentage™ APOPTOSIS Assay, Biocolor, UK) 및 아넥신 V용 시험법(예를 들어, Annexin V-Biotin Apoptosis Detection Kit, BioVision Inc., Mountain View, CA)을 포함한다.

[0144] **IV. 종양학적 장애의 치료**

[0145] 본 발명은 CoQ10을 종양학적 장애를 치료하거나 예방하기에 충분한 양으로 인간에게 투여하여 인간의 종양학적 장애를 치료하거나 예방하는 것을 포함하는 인간 내 종양학적 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0146] 본 발명은 또한 CoQ10 조성물 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 바람직하게, 상기 조성물은 적어도 약 1% 내지 약 25% CoQ10 w/w를 포함한다. CoQ10은 UBIDECARENONE (USP)으로서 제조원[Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japan)]으로부터 구입할 수 있다. CoQ10은 또한 분말 형태로 Kaneka Q10 (USP UBIDECARENONE)으로서 제조원 [Kaneka Q10]으로부터 구입할 수 있다(Pasadena, Texas, USA). 본원에 예시된 방법에 사용된 CoQ10은 하기의 특징을 갖는다: 잔사 용매는 USP 467 요건을 충족한다; 물 함량은 0.0% 미만, 0.05% 미만 또는 0.2% 미만이고; 연소시 잔사는 0.0%, 0.05% 미만, 또는 0.2% 미만이고; 중금속 함량은 0.002% 미만 또는 0.001% 미만이고; 순도는 98 내지 100% 또는 99.9%, 또는 99.5%이다. 조성물을 제조하기 위한 방법은 하기의 실험 섹션에서 제공된다.

[0147] 본원에서 사용하는 "종양학적 장애"는 인간 내에서 발견되는 모든 종류의 암 또는 신생세포 또는 악성 종양을 지칭하며, 백혈병, 림프종, 악성 흑색종, 암종 및 육종을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원에서 사용되는 것으로서, "종양학적 장애", "암", "신생세포" 및 "종양"이란 용어 또는 언어가 상호교차적으로단수 또는 복수의 형태로 사용되며, 이는 악성 형질 전환을 일으켜 숙주 유기체에 질병을 제공하는 세포를 지칭한다. 최초 암 세포(즉, 악성 형질 전환 위치 근처로부터 얻어진 세포)는 잘 성립된 기법, 특히 조직학적 검사에 의해 비-종양성 세포로부터 쉽게 구별될 수 있다. 본원에서 사용되는 종양성 세포의 정의에는 최초 암 세포와 암 전구 (progenitor) 세포 또는 종양 세포 조상으로부터 유도된 어떤 세포 뿐만 아니라 종양 줄기 세포 역시 포함된다. 이는 전이된 암 세포 및 시험관내 배양 및 암 세포로부터 유도된 세포주를 포함한다. 일반적으로 고품 암으로서 나타내지는 암 형태를 지칭할 때, "임상적으로 검출가능한" 암은 암 덩어리에 기반하여 검출 가능하며; 예를 들어 CAT 스캔, MR 이미지, X-선, 초음파 또는 촉진과 같은 과정 및/또는 환자로부터 얻어지는 표본 내에 하나 이상의 암-특정 항원의 발현으로 인해 검출 가능한 과정에 의한다.

[0148] "육종(sarcoma)"라는 용어는 일반적으로 배아 연결 조직(embryonic connective tissue)와 같은 물질로 만들어진 종양을 의미하고, 그리고 일반적으로 미소섬유(fibrillar)에 함몰된, 긴밀하게 충전(packed)된 세포로 구성되어 있다. 환경 영향 인자로 치료될 수 있는 육종의 예는 연골육종(chondrosarcoma), 섬유육종(fibrosarcoma), 림프 육종(lymphosarcoma), 흑색육종(melanosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 골육종(osteosarcoma), 아베메티 육종(Abemethy's sarcoma), 지질질 육종(adipose sarcoma), 지질육종(liposarcoma), 포상 연부 육종(aveolar soft part sarcoma), 범랑아 육종(ameloblastic sarcoma), 포도육종(botryoid sarcoma), 녹색 육종(chloroma sarcoma), 융모암종(chorio carcinoma), 배아 육종(embryonal sarcoma), 윌름 종양 육종(Wilms' tumor sarcoma), 자궁내막버팀 육종(endometrial sarcoma), 기질육종(stromal sarcoma), 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 근막 육종(fascial sarcoma), 섬유아세포 육종(fibroblastic sarcoma), 거대 세포 육종(giant cell sarcoma), 과립구성 육종(granulocytic sarcoma), 호지킨 육종(Hodgkin's sarcoma), 특발성 다색소 용혈성 육종(idiopathic multiple pigmented hemorrhagic sarcoma), B 세포 면역아세포 육종(immunoblastic sarcoma of B cells), 림프종(lymphoma), T 세포 면역아세포 육종(immunoblastic sarcoma of T-cells), 쟈슨 육종(Jensen's sarcoma), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 쿠퍼 세포 육종(Kupffer cell sarcoma), 혈관육종(angiosarcoma), 백혈육종(leukosarcoma), 악성 간엽세포 육종(malignant mesenchymoma sarcoma), 골주위 육종(parosteal sarcoma), 망상 적혈구 육종(reticulocytic sarcoma), 라우스 육종(Rous sarcoma), 혈청 육종(serocystic sarcoma), 활액막 육종(synovial sarcoma), 그리고 모세혈관확장성 육종(telangiectaltic sarcoma)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0149] "흑색종(melanoma)"이라는 용어는 피부 및 다른 기관의 색소 시스템(melanocytic system)으로부터 나타나는 종양을 의미한다. 본 발명의 환경 영향인자로 치료될 수 있는 흑색종은, 예를 들면, 말단흑자 흑색종(acral-lentiginous melanoma), 무색소 흑색종(amelanotic melanoma), 양성 소아 흑색종(benign juvenile melanoma), 클라우드만 흑색종(Cloudman's melanoma), S91 흑색종(S91 melanoma), 하딩-파세이 흑색종(Harding-Passey melanoma), 소아 흑색종(juvenile melanoma), 악성 흑자 흑색종(lentigo maligna melanoma), 악성 흑색종(malignant melanoma), 결정성 흑색종(nodular melanoma), 손발톱밑 흑색종(subungal melanoma), 그리고 얇은 확산 흑색종(superficial spreading melanoma)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0150] "암종(carcinoma)"은 주변 조직으로 투과하려는 경향이 있어 전이를 야기하는 상피세포로부터 만들어진, 새로운 악성 성장을 의미한다. 본 발명의 환경 영향인자로 치료될 수 있는 암종은, 예를 들면, 샘파리세포 암종(acinar carcinoma), 선방상 암종(acinous carcinoma), 샘낭 암종(adenocystic carcinoma), 선낭 암종(adenoid cystic

carcinoma), 선 암종(carcinoma adenomatosum), 부신 피질 암종(carcinoma of adrenal cortex), 폐포성 암종(alveolar carcinoma), 폐세포 암종(alveolar cell carcinoma), 기저세포 암종(basal cell carcinoma), 염기성 세포 암종(carcinoma basocellulare), 기저 암종(basaloid carcinoma), 기저 세포 암종(basosquamous cell carcinoma), 기관지폐포 암종(bronchioalveolar carcinoma), 세기관지성 암종(bronchiolar carcinoma), 기관지 원성 암종(bronchogenic carcinoma), 대뇌양 암종(cerebriform carcinoma), 쓸개관 세포 암종(cholangiocellular carcinoma), 융모성 암종(chorionic carcinoma), 콜로이드질 암종(colloid carcinoma), 먼포성 암(comedo carcinoma), 자궁체부암(corpus carcinoma), 소공질 암종(cribriform carcinoma), 갑옷 암(carcinoma en cuirasse), 피각 암종(carcinoma cutaneum), 원주성 암(cylindrical carcinoma), 원주상피세포 암(cylindrical cell carcinoma), 도관암(duct carcinoma), 두립 암종(carcinoma durum), 배아 암종(embryonal carcinoma), 뇌종양(encephaloid carcinoma), 표피암(epiermoid carcinoma), 선양 상피성 암(carcinoma epitheliale adenoides), 외장성 선암(exophytic carcinoma), 궤양성 선암(carcinoma ex ulcere), 섬유 선암(carcinoma fibrosum), 젤라틴 모양 선암(gelatiniform carcinoma), 젤라틴성 암(gelatinous carcinoma), 거대 세포 선암(giant cell carcinoma), 거대적혈구 선암(carcinoma gigantocellulare), 샘 암종(glandular carcinoma), 과립막 세포 암(granulosa cell carcinoma), 털기질암종(hair-matrix carcinoma), 혈액 암종(hematoid carcinoma), 간암세포 암종(hepatocellular carcinoma), 허슬세포 암종(Hurthle cell carcinoma), 히알린 암종(hyaline carcinoma), 히알린성 암종(hyemephroid carcinoma), 유아 배아 암종(infantile embryonal carcinoma), 인시추 암종(carcinoma in situ), 표피내 암종(intraepidermal carcinoma), 상피내 암종(intraepithelial carcinoma), 크로페처 암종(Krompecher's carcinoma), 쿨치스키 암종(Kulchitzky-cell carcinoma), 큰 세포 암종(large-cell carcinoma), 수정체 암종(lenticular carcinoma), 수정체양 암종(carcinoma lenticulare), 지질성 암종(lipomatous carcinoma), 림프상피세포성 암종(lymphoepithelial carcinoma), 수질 암종(carcinoma medullare), 수질성 암종(medullary carcinoma), 흑색 암종(melanotic carcinoma), 연성 암종(carcinoma molle), 점성 암종(mucinous carcinoma), 점액분비 암종(carcinoma muciparum), 점액분비성 암종(carcinoma mucocellulare), 점막표피 암종(mucoepidermoid carcinoma), 점막암(carcinoma mucosum), 점액질 암종(mucous carcinoma), 점액종(carcinoma myxomatodes), 상인두암(nasopharyngeal carcinoma), 귀리세포 암(oat cell carcinoma), 화골성 암종(carcinoma ossificans), 유골 선암(osteoid carcinoma), 유두암(papillary carcinoma), 문맥주위 선암(periportal carcinoma), 자궁경부상피내 암(preinvasive carcinoma), 극세포 암(prickle cell carcinoma), 반액성 암종(pultaceous carcinoma), 신장의 신세포 암종(renal cell carcinoma of kidney), 저장세포 암종(reserve cell carcinoma), 육종성 암종(carcinoma sarcomatodes), 슈나이더리안 암종(schneiderian carcinoma), 경암(scirrhus carcinoma), 음낭암(carcinoma scroti), 인환세포 암(signet-ring cell carcinoma), 단순암(carcinoma simplex), 작은 세포 선암(small-cell carcinoma), 원통형 암종(solanoid carcinoma), 타원형 세포 암종(spheroidal cell carcinoma), 방추세포 암종(spindle cell carcinoma), 해면 암종(carcinoma spongiosum), 편평상피암(squamous carcinoma), 편평상피세포 암종(squamous cell carcinoma), 스트링 암종(string carcinoma), 혈관확장 선암(carcinoma telangiectaticum), 혈관확장성 선암(carcinoma telangiectodes), 이행상피 암(transitional cell carcinoma), 결정성 암종(carcinoma tuberosum), 결절성 암종(tuberous carcinoma), 우상암(verruccous carcinoma), 그리고 융모암(carcinoma villosum)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0151] 일반적으로, CoQ10은 어떠한 신생세포(neoplasm)를 예방적으로 또는 치료적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시예에서, CoQ10은 고체 종양을 치료하기 위해 사용된다. 본 발명의 다양한 실시예에서, CoQ10은 피부암 [예를 들면, 편평상피세포 암종(squamous cell carcinoma) 또는 기저세포 암종(basal cell carcinoma)], 간암 또는 뼈암, 유방암, 전립선암, 간암 또는 골암(bone cancer)의 다양한 종류를 치료하기 위해 사용된다. 한 실시예에서, CoQ10은, 편평상피세포 암종(SCCIS(in situ) 및 보다 공격적인 편평상피세포 암종을 포함), 기저세포 암종(얇은, 결정성 및 투과성 기저세포 암종을 포함), 흑색종 및 자외선 각화증(actinic keratosis)을 포함하지만 이로 제한되지 않은 피부 종양학적 장애를 치료하기 위해 사용된다. 하지만, CoQ10을 사용한 치료는 상기 암으로 제한되지 않는다. CoQ10을 사용한 치료를 받아들일 수 있는 암의 예는 뇌, 머리 및 목, 전립선, 유방, 고환, 췌장, 간, 결장(colon), 방광, 신장, 폐, 비소세포성 폐, 흑색종, 중피종(mesothelioma), 자궁, 자궁 경관(cervix), 난소, 육종, 뼈, 위 및 수모세포종(Medulloblastoma)의 암을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0152] CoQ10을 사용하여 치료될 수 있는 추가적 암은, 예를 들면 호지킨 질병(Hodgkin's Disease), 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin's Lymphoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 신경아종(neuroblastoma), 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 폐암(lung cancer), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 원발성 혈소판증가증(primary thrombocytosis), 원발성 고분자 글로불린혈증(primary macroglobulinemia), 소세포 폐 종양(small-

cell lung tumors), 원발성 뇌종양(primary brain tumors), 위암(stomach cancer), 결장암(colon cancer), 악성 췌장 인슐린종(malignant pancreatic insulanoama), 악성 암양종(malignant carcinoid), 비뇨기 방광암(urinary bladder cancer), 전암 피부 병변(premalignant skin lesions), 고환암(testicular cancer), 림프종(lymphomas), 갑상선 암(thyroid cancer), 신경아종(neuroblastoma), 식도암(esophageal cancer), 요생식로암(genitourinary tract cancer), 악성 고칼슘혈증(malignant hypercalcemia), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 부신피질암(adrenal cortical cancer), 그리고 전립선암(prostate cancer)을 포함한다. 한 실시예에서, CoQ10을 사용하여 치료될 수 있는 종양학적 장애 또는 암은 흑색종이 아니다.

[0153] 여기서 사용되는 암세포의 정의는 혐기성 당분해(anaerobic glycolysis) (예를 들면, 당분해 후 시토솔에서 젖산 발효가 일어남), 호기성 당분해(aerobic glycolysis) (예를 들면 당분해 후 미토콘드리아에서 피루베이트(피루베이트)의 산화가 일어남), 또는 혐기성 당분해 및 호기성 당분해의 혼합에 의해 에너지를 생산하는 암세포를 포함하려는 의도를 갖는다. 하나의 실시예에서, 암세포는 우선적으로 혐기성 당분해에 의해서 에너지를 생산한다(예를 들면, 세포 에너지의 최소 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상은 혐기성 당분해에 의해 생산된다). 하나의 실시예에서, 암세포는 우선적으로 호기성 당분해에 의해 에너지를 생산한다(예를 들면, 세포 에너지의 최소 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상은 호기성 당분해에 의해 생산된다). 또한, 여기서 사용되는 암세포의 정의는 암세포 집단 및 혐기성 당분해에 의해 에너지를 생산하는 세포 및 호기성 당분해에 의해 에너지를 생산하는 세포를 포함하는 암세포의 혼합물을 포함한다. 하나의 실시예에서, 암세포 집단은 우선적으로 혐기성 당분해에 의해서 에너지를 생산한다(예를 들면, 상기 집단에서 최소 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 세포는 혐기성 당분해에 의해 에너지를 생산한다). 하나의 실시예에서, 암세포 집단은 우선적으로 호기성 당분해에 의해 에너지를 생산한다(예를 들면, 상기 집단의 최소 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 세포).

[0154] 여기서 사용되는 것과 같이, "글루코스의 혐기성 사용(anaerobic use of glucose)" 또는 "혐기성 당분해(anaerobic glycolysis)"는 당분해 후 시토솔(cytosol)에서의 젖산 발효에 의한 세포의 에너지 생산을 의미한다. 예를 들면, 많은 암세포는 혐기성 당분해에 의해 에너지를 생산한다.

[0155] 여기서 사용되는 것과 같이, "글루코스의 호기성 사용(aerobic use of glucose)" 또는 "미토콘드리아성 산화적 인산화(mitochondrial oxidative phosphorylation)"는 당분해 후 미토콘드리아에서 피루베이트의 산화과정에 의한 세포 에너지 생산을 의미한다.

[0156] 여기서 사용되는 것과 같이, "글루코스의 혐기성 사용을 차단할 수 있는(capable of blocking anaerobic use of glucose) 및 미토콘드리아성 산화적 인산화의 증가(augmentating mitochondrial oxidative phosphorylation)"란 표현은 혐기성 당분해로부터 호기성 당분해 또는 미토콘드리아성 산화적 인산화로 세포의 대사상태를 옮기거나 또는 변화시키도록 유도하는, 환경 영향 인자(예를 들면, 외대사성 변환인자; epimetabolic shifter)의 능력을 의미한다.

[0157] 본원의 일부 구체예로, 치료될 종양학적 장애는 치료학적 유효 수준으로 활성제제의 체계적 전달이 기대되는, 국소 투여를 거쳐 일반적으로 처리되는 장애가 아니다. 본원에서 사용되는 것으로서, "국소 투여를 거쳐 일반적으로 처리되는 장애가 아닌"이란 문구는 전형적이지 않거나, 국소 투여에 의해 치료학적 제제를 쉽게 처리하기 보다는, 치료학적 제제를 일반적으로 예를 들면, 정맥 투여를 거쳐 처리하는 종양학적 장애를 지칭한다. 국소 투여를 거쳐 일반적으로 처리되지 않는 종양학적 장애는 유방암, 고환암, 간암, 췌장암 및 골암을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0158] 본 발명은 또한 덜 공격적이거나 비-공격적인 종양학적 장애를 위해 선택되거나 사용되는 용량 용법보다 더 저용량으로 선택된 양으로 CoQ10을 인간에게 투여하여 공격적인 종양학적 장애를 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는, 인간의 공격적 종양학적 장애를 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다. 연관된 측면으로, 본 발명은 공격적인 종양학적 장애를 위해 선택되거나 사용되는 용량 용법보다 더 고용량으로 선택된 양으로 환경 영향 인자를 인간에게 투여하여 비-공격적인 종양학적 장애를 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는, 인간의 비공격적 종양학적 장애를 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0159] 본원에서 사용되는 것과 같이, "공격적인 종양학적 장애(aggressive oncological disorder)"는 빠르게 성장하는 종양과 연관된 종양학적 장애를 의미한다. 전형적으로, 공격적인 종양학적 장애는 치료적 치료(therapeutic treatment)에 대해 반응하지 않거나 또는 매우 낮은 수준으로 반응한다. 공격적인 종양학적 장애의 예는 췌장암종(pancreatic carcinoma), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 윙잉 육종(Ewing's sarcoma), 전이성 유방암(metastatic breast cancer), 전이성 흑색종(metastatic melanoma), 뇌암[성상세포종(astrocytoma), 교아

세포종(glioblastoma)], 신경 내분비 암(neuroendocrine cancer), 결장암(colon cancer), 폐암(lung cancer), 골육종(osteosarcoma), 안드로겐-비의존적 전립선암(androgen-independent prostate cancer), 난소암(ovarian cancer) 및 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's Lymphoma)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0160] 여기서 사용되는 것과 같이, "비공격적인 종양학적 장애(non-aggressive disorder)"라는 용어는 천천히 성장하는 종양에 연관된 종양학적 장애를 의미한다. 전형적으로, 비공격적인 종양학적 장애는 치료적 치료에 대해 순조롭게(favorably) 또는 중간 수준으로(moderately) 반응한다. 비공격적인 종양학적 장애의 예는 비전이성 유방암(non-metastatic breast cancer), 안드로겐-의존적 전립선암(androgen-dependent prostate cancer), 소세포성 폐암(small cell lung cancer) 및 급성 림프구 백혈병(acute lymphocytic leukemia)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 실시예에서, 비공격적인 종양학적 장애는 공격적인 종양학적 장애가 아닌 모든 종양학적 장애를 포함한다.

[0161] 하나의 구체예에서, CoQ10은 암 크기를 감소시키고, 암 성장을 저해하고/하거나 암을 겪고 있는 대상의 생존 기간을 연장한다. 따라서, 본 발명은 또한 인간 또는 동물에게 CoQ10의 효과적이고 비-독성적인 양을 투여함으로써 인간 또는 다른 동물 내 암을 치료하는 방법과 연관된다. 당업자는 반복적인 실험에 의해 CoQ10의 효과적이고, 비-독성적인 양이 악성 종양을 치료할 목적 하에서 얼마나 되는지를 결정할 수 있다. 예를 들어, CoQ10의 치료학적 활성 양은 질병 단계(예를 들어, 단계 I 대 단계 IV), 나이, 성별, 의학적 문제(예를 들어, 면역억제된 조건 또는 질병) 및 대상의 몸무게 및 CoQ10이 대상에게 요구되는 반응을 끌어오는 능력과 같은 인자에 따라, 다양할 수 있다. 용법 용량은 최적의 치료 응답을 제공하도록 조절될 수 있다. 예를 들어, 여러 개로 분할된 용량을 매일 투여하거나, 치료적 상황의 긴급 사태에 의해 지시된 바 대로 용량을 비례적으로 감소시킬 수도 있다.

[0162] **V. 종양학적 장애의 치료 대상**

[0163] 본 발명은 종양학적 장애의 치료 대상을 확인하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가적으로 그러한 방법에 의해 확인된 치료 대상을 제공한다. 치료 대상의 확인은 일반적으로 세포 또는 세포주 관별에의 env-영향 인자 또는 env-영향 인자 후보의 외인성 적용 및 뒤이어 대조군, 처리되지 않은 세포와 비교하였을 때, 처리된 세포에 유도되는 변화의 평가와 관련된다. 관찰되는 유도된 세포적 변화는 형태학적 변화, 생리학적 변화 또는 조성의 변화, 예를 들어, 세포내 RNA, 단백질, 지질 또는 대사산물의 수준을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 후보 Env-영향 인자에 의해 처리된 결과로서 유도된 세포내 변화는 본원에서 기술하는 어떤 시험법을 사용함으로써 관찰될 수 있다. 예를 들어, mRNA 수준에 대한 유전자 발현의 변화는 실시간 PCR 어레이에 의해 평가될 수 있으며, 단백질 수준에서의 유전자 발현 변화는 항체 마이크로어레이 및 2-D 겔 전기영동을 사용함으로써 관찰될 수 있다. 후보 Env-영향 인자에 의해 조절되는 것으로 확인된 유전자(예를 들어, mRNA 및/또는 단백질 수준에서)는 이후, 경로 분석(Ingenuity IPA software)을 사용하여 시스템 생물학적 관점 및 공지된 문헌의 검토를 통해 평가될 수 있다. 잠재적 치료 대상으로서 확인된 유전자는 다음으로 서던 블랏(Western blot) 분석, siRNA 낙다운(knock down) 또는 재조합 단백질 생산 및 확인법과 같은 확증적인 시험법을 하게 된다. 스크리닝 시험법은 이후에 대상의 조절자를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 치료 대상의 조절자는 종양학적 장애의 신규한 치료제로서 유용하다. 치료 대상의 조절자는 본원에서 자세하게 기술하는 스크리닝 시험법 또는 당업자에게 잘 알려진 일상화된 방법들을 사용하여 반복적으로 확인될 수 있다.

[0164] MIM/Epi-전환인자, CoQ10에 의해 조절되는 것으로 본원에서 확인된 (예를 들어, mRNA 또는 단백질 수준에서 상향 조절되거나 하향 조절되는) 유전자는 본 발명의 약물 대상이다. 본 발명의 약물 대상은 본원의 표 1-28(예를 들어, 표 2-4 & 6-28)에 뒤이어 목록화된 유전자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원에서 출원인에 의해 기술된 실험 결과에 기반하여, Q10에 의해 조절되는 주요 단백질은 전사 인자, 세포 사멸 반응, 펜토오즈 포스페이트 경로, 생합성 경로, 산화적 스트레스(pro-oxidant), 막 변화 및 산화적 인산화 대사를 포함하는 분자의 다른 경로 또는 그룹과 관련 또는 구분될 수 있다. 본원에서 제공되는 결과에 기반한 CoQ10에 의해 조절되는 주요 단백질은 하기와 같이 요약된다. CoQ10에 의해 조절되는 주요 단백질이면서 전사인자인 HNF4알파이다. CoQ10에 의해 조절되고 아포토시스 반응과 관련되는 주요 단백질은 Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA 및 cMyc을 포함한다. CoQ10에 의해 조절되고, 펜토오즈 포스페이트 경로와 관련되는 주요 단백질은 트랜스알돌라제 1이다. CoQ10에 의해 조절되고 생합성 경로와 관련되는 주요 단백질은 COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제 및 4-하이드로벤조에이트이다. CoQ10에 의해 조절되고 산화적 스트레스(pro-oxidant)와 관련되는 주요 단백질은 호중구 시토졸 인자 2, 산화질소 합성효소 2A 및 과산화물 제거효소 2(미토콘드리아성)이다. CoQ10에 의해 조절되고, 산화적 인산화 대사와 관련되는 주요 단백질은 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체x III 및 복합체 IV이다. CoQ10에 의해 직접 또는 간접적으로 조절되는 추

가의 주요 단백질은 Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C, 그리고 Cam 키나제 II를 포함한다.

[0165] 따라서, 본 발명에 따른 하나의 구체예에서, 약물 대상은 HNF4- $\alpha$ , Bcl-x1, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, 트랜스알돌라제 1, COQ1, COQ3, COQ6, 프레닐트랜스퍼라제, 4-하이드로벤조에이트, 호중구 시토졸 인자 2, 산화질소 합성효소 2A, 과산화물 제거효소2, VDAC, Bax 통로, ANT, 시토크롬 c, 복합체 1, 복합체 II, 복합체 III, 복합체 IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C, 그리고 Cam 키나제 II를 포함할 수 있다. 바람직한 구체예로서, 약물 대상은 HNF4A, 트랜스알돌라제, NM23 및 BSCv를 포함한다. 하나의 구체예로서, 약물 대상은 TNF4A이다. 하나의 구체예에서, 약물 대상은 트랜스알돌라제이다. 하나의 구체예에서, 약물 대상은 NM23이다. 하나의 구체예에서, 약물 대상은 BSCv이다. 확인된 약물 대상의 조절자를 확인하기 위해 유용한 스크리닝 시험법은 하기에 기술된다.

[0166] **VI. 스크리닝 시험법**

[0167] 본 발명은 또한 본 발명의 확인된 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 조절하는 조절자, 예를 들어 후보 또는 시험 화합물 또는 제제(예를 들어, 단백질, 펩타이드, 펩티도미메틱, 펩티드, 작은 분자 또는 다른 약물)를 확인하기 위한 방법("스크리닝 시험법"으로서 본원에서 또한 지칭됨)을 제공한다. 그러한 시험법은 일반적으로 본 발명의 치료 대상과 하나 이상의 시험법 성분 사이의 반응을 포함한다. 다른 성분은 시험 화합물 그 자체이거나 시험 화합물과 본 발명에 따른 마커의 자연적 결합 파트너의 조합이다. 본원에 기재된 것과 같은 시험법을 거쳐 확인된 화합물은 예를 들면, 중앙학적 장애를 치료하거나 예방하는데 있어 유용하다.

[0168] 본 발명의 스크리닝 시험법에서 사용되는 시험 화합물은 천연 및/또는 합성 화합물의 체계적인 라이브러리를 포함하는 어떤 활용 가능한 원천으로부터 획득될 수 있다. 시험 화합물은 또한 생물학적 라이브러리; 펩티드 라이브러리(효소적 분해에 저항성이 있지만 그럼에도 불구하고 생활성으로 남아있는, 신규한 비-펩타이드성 골격이나 펩타이드 기능성을 갖는 분자의 라이브러리; 예를 들면, Zuckermann *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-85 참조); 공간적으로 다루어질 수 있는 병렬 고체상 또는 용액상 라이브러리; 디콘볼루션(deconvolution)을 요구하는 합성 라이브러리 방법; '하나의 비드 하나의-화합물' 라이브러리법; 및 친화 크로마토그래피 선택을 사용하는 합성 라이브러리법을 포함하는 공지의 조합 라이브러리 법에 따라 수많은 접근법에 의해 획득될 수 있다. 생물학적 라이브러리 및 페티드 라이브러리 접근법은 펩타이드 라이브러리로 제한되지만, 다른 4가지 접근법은 펩타이드, 비-펩타이드 올리고머 또는 화합물의 작은 분자 라이브러리에 적용가능하다(Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

[0169] 분자 라이브러리의 합성을 위한 방법의 예는 당업계, 예를 들면 DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; 및 Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233에서 발견된다.

[0170] 화합물의 라이브러리는 용액 내 (예를 들면, Houghten, 1992, *Biotechniques* 13:412-421), 또는 비드 위 (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), 칩(Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), 박테리아 및/또는 공극 (Ladner, USP 5,223,409), 플라즈미드 (Cull *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) 또는 파지(Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner, *supra.*) 위에 존재할 수 있다.

[0171] 본 발명의 스크리닝 방법은 시험 화합물과 세포가 접촉하는 단계 및 시험 화합물이 세포내 본 발명의 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 조절하는 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 치료 대상의 발현 및/또는 활성은 본원에서 기술한 바에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 치료 대상의 발현 및/또는 활성은 또한 당업계에 알려진 일상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 구체예로, 화합물은 본 발명에 따른 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 그 능력에 기반하여 선택된다. 하나의 구체예로, 화합물은 표 1-28(예를 들어, 표 2-4 & 6-28)에 목록화된 단백질로부터 선택되는 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 그 능력에 기반하여 선택되며, 여기서 치료 대상은 CoQ10에 의해 상향 조절(예를 들어, 양성-배수 변화를 보임)된다. 하나의 구체예로, 화합물은 본 발명에 따른 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 그 능력에 기반하여 선택된다. 하나의 구체예로, 화합물은 표 1-28(예를 들어, 표 2-4 & 6-28)에 목록화된 단백질로부터 선택되는 치료 대상의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 그 능력에 기반하여 선택되며, 여기서 치료 대상은 CoQ10에 의해 하향 조절(예를 들어, 음성-배수 변화를 보임)된다.



[0172] 또 다른 구체예로, 본 발명은 본 발명에 따른 치료 대상 또는 이의 생물학적 활성 부분의 기질인, 후보 또는 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 시험법을 제공한다. 아직 또 다른 구체예로, 본 발명은 본 발명의 치료용 항체 또는 이의 생물학적 활성 부분에 결합하는 후보 또는 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 시험법을 제공한다. 시험 화합물이 치료 대상에 직접적으로 결합하는 능력을 결정하는 것은 예를 들면, 화합물을 방사성 동위 원소 또는 효소적 라벨로 커플링함으로써 달성되며, 그러한 화합물의 약물 대상에 대한 결합은 복합체 내 라벨링된 마커 화합물을 검출하는 것에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 화합물(예로서, 마커 기질)은 <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, 또는 <sup>3</sup>H, 그리고 직접적인 전과 방출의 계산 혹은 신틸레이션 계산에 의해 검출되는 방사성 동위원소로 직접적 혹은 간접적으로 라벨링될 수 있다. 대안적으로, 시험법 성분은 효소적으로, 예를 들면 거자무과산화효소, 알카리 포스파타아제 또는 루시페라제, 그리고 적절한 기질의 제품으로의 변환을 결정함으로써 검출되는 효소적 라벨에 의해 라벨링될 수 있다.

[0173] 본 발명은 상기 기재된 스크리닝 시험법에 의해 확인된 신규한 제제로 더욱 적용된다. 따라서, 본원에서 기술된 대로 확인된 제제를 적절한 동물 모델에서 더욱 사용하는 것은 본 발명의 범위 내이다. 예를 들어, 본원에서 기술된 바와 같이 확인된 본 발명에 따르는 마커의 발현 및/또는 활성을 조절하도록 하는 제제는, 효능, 독성, 또는 그러한 제제로 치료하였을 때의 부작용을 결정하기 위해 동물 모델 내에서 사용될 수 있다. 다르게는, 본원에 기술된 바와 같이 확인된 제제는 그러한 제제의 행동 기전을 결정하기 위하여, 동물 모델 내에서 사용될 수 있다. 더욱이 본 발명은 앞서 기술된 치료를 위해, 상기 기술된 스크리닝 시험법에 의해 확인되는 신규한 제제의 용도에 적용된다.

[0174] **VII. 약제학적 조성물 및 약제학적 투여**

[0175] 본 발명은 CoQ10을 포함하는 조성물을 제공한다. 개체에 투여되는데 적합한 약학적 조성물 내에 CoQ10이 포함될 수 있다. 전형적으로, 약학적 조성물은 CoQ10 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 여기 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용되는 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅, 항박테리아 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 그리고 기타 생리학적으로 적합한 것을 포함한다. 약학적으로 허용되는 담체의 예로는 하나 또는 그 이상의 물, 생리식염수, 인산완충생리식염수, 텍스트로오즈, 글리세롤, 에탄올 및 기타 등, 뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 다수 경우에 있어서, 등장화제, 예를 들면 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 소디움 클로라이드가 조성물 중에 포함되는 것이 바람직할 것이다. 약학적으로 허용되는 담체는 또한 소량의 부수적 물질 예컨대 습윤제 및 에멀전화제, 방부제, 또는 완충액을 포함하며, 이들은 환경 영향인자의 유통기한(shelf life) 및 유효성을 증진시킨다.

[0176] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 예를 들면 액상, 반-고형 및 고형 제제형태, 예컨대 액상 용액(예를 들면 주사용 및 불용해성 용액), 분산제 또는 현탁제, 정제, 환약, 분말제, 크림, 로션, 리니먼트제, 연고 또는 페이스트제, 안구, 귀 또는 코 투여를 위한 점적제, 리포솜 및 좌제를 포함한다. 바람직한 제형은 의도된 투여 및 치료 적용 모드에 따라 달라질 것이다.

[0177] CoQ10은 이 기술분야에 알려진 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 다수의 치료 적용법에서, 바람직한 투여 경로/모드는 국소 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입(infusion)이다. 기술자에의해 이해될 수 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 모드는 원하는 결과에 따라 다양할 것이다. 어떤 실시양태에서, 활성 화합물은 급속 방출로부터 화합물을 보호할 수 있는 담체, 임플란트, 경피 패치제(transdermal patches), 그리고 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 예컨대 방출조절형 제제와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 폴리머가 사용될 수 있으며, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르쏘에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 상기 제형의 제조에 사용되는 다수의 방법은 특허되어 있거나 이 기술분야의 기술자에게 일반적으로 잘 알려져 있다. 예컨대, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조. 일 실시양태에서, 투여 모드는 비경구(예컨대 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 일 실시양태에서 환경 영향인자는 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 환경 영향인자는 근육내 또는 피하 주사로 투여된다. 바람직한 실시양태에서, 환경 영향인자는 국소적으로 투여된다.

[0178] 치료 조성물은 전형적으로 멸균되어야 하며 제조 및 보관 상태에서 안정해야 한다. 조성물은 용제, 마이크로에멀전, 분산제, 리포솜 또는 기타 고 약물 농도에 적합한 정렬된 구조로 제형화될 수 있다. 멸균된 주사용 용제는 상기 열거된 구성성분 하나 또는 그 조합과 함께 적절한 용매중에 필요량의 활성 화합물(즉, 환경 영향인자)을 포함시킴으로써 제조될 수 있으며, 필요한 경우 여과 멸균시킬 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화

합물을 상기 열거된 것들로부터의 필요한 기타 구성성분과 기본 분산매(basic dispersion medium)를 함유하는 멸균 비히클로 포함시킴으로써 제조된다. 멸균의 경우, 멸균 주사 용제 제조를 위한 동결건조된 분말은, 바람직한 제조방법은 이전에 멸균-여과된 이들 용액으로부터의 활성 구성성분 플러스 임의의 추가적 바람직한 구성성분의 분말을 얻는 진공 건조 및 스프레이-건조이다. 용액의 적정 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산제의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사용 조성물의 지속적 흡수는 예를 들면 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 조성물 중에 포함시킴으로써 유발될 수 있다.

[0179] 기술 및 제형은 일반적으로 Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa에서 발견될 것이다. 전신 투여를 위해, 주사가 바람직하며, 근육내, 정맥내, 복강내 및 피하 주사를 포함한다. 주사를 위해, 본 발명의 화합물은 액상 액제, 바람직하게는 헝크 액(Hank's solution) 또는 링거 액(Ringer's solution)과 같은 생리학적으로 적합한 완충액 중에서 제형화될 수 있다. 또한, 화합물은 고체제형으로 제형화될 수 있고, 사용 전 즉시 재분산되거나 현탁될 수 있다. 동결건조된 형태가 또한 포함된다.

[0180] 경구 투여를 위해, 약제학적 조성물은 예컨대 결합제(예를 들면 전젤라틴화된 메이즈 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로오즈); 필러(예를 들면, 락토오즈, 미세결정성 셀룰로오즈 또는 칼슘 하이드로젠 포스페이트); 윤활제(예를 들면 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제(예를 들면 감자 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들면 소듐 라우릴 설페이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 통상적 방법으로 제조되는 정제 또는 캡셀제의 형태로 투여될 수 있다. 정제는 이 기술분야에 잘 알려진 방법으로 코팅될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제는 예를 들면 액제, 시럽 또는 현탁제의 형태로 투여될 수 있거나, 또는 그들은 사용전에, 물 또는 기타 적합한 비히클과 함께 구성되는 건조 물로서 존재할 수도 있다. 이러한 액상 제제는 약제학적으로 허용되는 첨가제, 예컨대 현탁화제(예를 들면 소르비톨 시럽, 셀룰로오즈 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 에멀전화제(예를 들면 레시틴 또는 아카시아); 비-액상 비히클(예를 들면 아티온드 오일(atond oil), 오일리 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획된 야채유); 및 방부제(예를 들면 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 함께 통상의 방법에 의해 제조될 수 있다. 제제는 또한 완충염, 향미제, 착색제 및 감미제를 적절하게 함유할 수 있다.

[0181] 경구 투여를 위한 제제는 활성 화합물의 방출 조절을 위해 적절하게 제형화될 수 있다. 구강(buccal) 투여를 위해 조성물을 통상의 방법으로 정제 또는 로젠지(lozenge)의 형태로 제형화할 수 있다. 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물은 압축 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 방식의 형태로 간편하게 전달되며, 적절한 추진제로 예를 들면 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적절한 가스를 사용할 수 있다. 압축된 에어로졸의 경우, 용량 단위는 측량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 캡셀제 및 흡입제 또는 취분기(insufflator)에 사용되기 위한 예컨대 젤라틴의 카트리지는 화합물 및 락토오즈 또는 전분과 같은 적절한 분말 베이스의 분말 믹스를 함유하는 형태로 제형화될 수 있다.

[0182] 화합물은 예컨대 볼루스 주사 또는 연속적 주입과 같은 주사로 비경구적 투여를 위해 제형화될 수 있다. 주사를 위한 제형은 예컨대 앰플 또는 다-용량 컨테이너에 첨가되는 보존제와 함께 단위 용량 형태로 존재할 수 있다. 조성물은 오일성 또는 액상 비히클로 현탁제, 액제 또는 에멀전의 형태로 투여될 수 있고, 현탁화, 안정화 및/또는 분산화제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 선택적으로, 활성 구성성분은 사용전에 적절한 비히클, 예를 들면 멸균된 발열성물질-없는(pyrogen-free) 물과 함께 구성되는 분말 형태일 수 있다.

[0183] 화합물은 예컨대 좌제 또는 보유 관장제(retention enemas), 예를 들면 통상의 좌제 기제 예컨대 코코아 버터 또는 기타 글리세리드를 함유하는 직장용 조성물로도 제형화될 수 있다.

[0184] 앞에 기재된 제형에 더하여, 화합물은 데포(depot) 제제로 제형화될 수도 있다. 이러한 오랜 시간 작용하는 제형은 임플란트(예컨대 피하로 또는 근육내로) 또는 근육내 주사로 투여될 수 있다. 따라서, 예컨대 화합물은 적절한 폴리머성 또는 소수성 물질(예를 들면 허용되는 오일중의 에멀전으로서) 또는 이온교환수지 또는 예컨대 조금 용해성이 있는 염으로서, 조금 용해성이 있는 유도체로 제형화될 수 있다.

[0185] 전신 투여는 경점막(transmucosal) 또는 경피 수단에 의해 될 수도 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 통과되는 장벽에 적합한 침투제가 제형 내에 사용될 수 있다. 그러한 침투제는 일반적으로 당업계에서 알려져 있고, 예를 들면, 경점막 투여를 위해서는 담즙산염 또는 푸시딘산 유도체이며, 추가로 세정제가 투과를 가능하게 하기 위하여 사용될 수 있다. 경점막 투여는 비강 분무를 통하거나 좌약을 사용할 수 있다. 국소 투여의 경우, 본 발명의 화합물은 당업계에 일반적으로 알려진 연고, 고약(salve), 겔 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 세척 용

액은 치유를 가속화하기 위하여, 상처 또는 염증을 치료하는데 국부적으로 사용될 수 있다.

- [0186] 조성물은, 요구되는 경우, 활성 성분을 담는 하나 이상의 단위 용량을 포함하는 팩 또는 용기 장치 내에 존재할 수 있다. 팩은 예를 들면, 블리스터(blister pack)과 같은, 금속 또는 플라스틱 호일을 포함한다. 팩 또는 용기 장치는 투여 기구에 수반될 수 있다.
- [0187] 핵산 투여와 관계되는 치료를 위해, 본 발명의 화합물(들)은 전신 및 국소 또는 국부 투여를 포함하는 다양한 투여 모드에 맞추어 제형화 될 수 있다. 기술 및 제형은 일반적으로 Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa.에서 찾을 수 있다. 전신 투여를 위해, 근육내, 정맥내, 복강내, 절내 및 피하내 주사를 포함하는 주사가 선호된다. 주사를 위해, 본 발명의 화합물(들)은 수용액으로, 바람직하게는 행크 액 또는 링거 액과 같은 생리학상 적합한 완충액으로 제형화될 수 있다. 추가로, 본 화합물(들)은 고형 및 사용 전에 즉시 재용해되거나 현탁되는 형태로 제형화될 수 있다. 동결 건조 형태가 또한 포함된다.
- [0188] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, CoQ10을 포함하는 조성물은 국소적으로 투여된다. 약제학적 제형으로서, 활성 성분, 즉 CoQ10이 존재하는 것이 선호된다. 국소 투여의 경우, 활성 성분은, 비록 30% w/w 정도 포함할 수는 있으나, 최종 제품 내 제형의 중량 기준으로 약 0.001% 내지 약 20% w/w, 바람직하게는 제형의 약 1% 내지 약 20% w/w을 포함할 수 있다. 본 발명의 국소 제형들은 활성 성분과 함께 그의 1개 이상의 허용되는 담체(들) 및 임의로 기타 치료 성분(들)을 포함한다. 이 담체(들)은 제형의 다른 성분들과 호환될 수 있고, 그의 수용체를 약화시키지 않는 의미로 "허용될 수" 있어야 한다.
- [0189] 관심있는 장애를 보이는 환자의 치료에 있어서, 치료적 유효량의 단일 약제나 이들과 같은 약제들이 투여된다. 치료적 유효량의 용량은 증상을 완화시키거나 또는 환자의 생존률을 늘려주는 화합물의 양을 의미한다.
- [0190] 그러한 화합물들의 독성 및 치료 효능은 예를 들면 LD50(개체군의 50%가 치사하는 용량) 및 ED50(개체군의 50%에서 치료 효과가 있는 용량)를 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물들에서 표준 제약 절차들에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수이고, 그것은 LD50/ED50 비율로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양물 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에게 사용하기 위한 복용량 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 복용량은 독성이 거의 없거나 또는 전혀 없는 ED50를 포함하여 순환하는 농도 범위 내에 놓이는 것이 바람직하다. 그 복용량은 사용된 복용량 및 이용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 변화할 수 있다.
- [0191] 본 발명의 방법에 사용된 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효량의 용량은 세포 배양물 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 예를 들면, 용량은 세포 배양물에서 결정되는 바와 같이 IC<sub>50</sub>을 포함하는 순환하는 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델들에서 제형될 수 있다. 그러한 정보는 인간에게 유용한 용량을 보다 정확히 결정하기 위해 사용될 수 있고, 혈장 내 수준은 예를 들면 HPLC에 의해 측정될 수 있다.
- [0192] 정확한 제형, 투여 경로 및 복용량은 환자의 상태를 관찰한 개별 내과의에 의해 선택될 수 있다 (예를 들면, Fingl et al., in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Ch.1, p.1 참조). 주치 내과의는 독성 또는 장기 기능 이상으로 인해 어떻게 그리고 언제 투여를 종료하거나, 중지하거나 또는 조절해야 할지 알 수 있어야 함에 주의해야 한다. 반대로, 주치 내과의는 임상 반응이 적절하지 않은 경우(독성 배제) 보다 높은 레벨로 치료를 조절하는 것을 알 수도 있다. 관심있는 중앙 질환의 관리에 있어, 투여된 용량의 규모는 치료해야 하는 증상의 심각도 및 투여 경로에 따라 변화할 것이다. 증상의 심각도는 예를 들면 표준 예후 평가 방법들에 의해 부분적으로 평가될 수 있다. 더욱이, 용량 및 용량 빈도는 개개의 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 변화할 수도 있다. 상기 고찰된 바에 필적하는 프로그램은 수의학에 사용될 수도 있다.
- [0193] 치료 중인 특정 증상에 따라, 그러한 약제들은 제형화될 수 있고, 전신 또는 국소로 투여될 수 있다. 제형 기술 및 투여는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990)에서 찾을 수 있다. 적절한 경로들은 경구, 직장, 경피, 절내, 점막내 또는 장내 투여; 근육내, 피하, 수내 (intramedullary) 주사 뿐만 아니라 낭내, 직접 심실내, 정맥내, 복강내, 비강내 또는 안구내 주사를 포함하는 비경구적 전달을 포함할 수 있으며, 이는 단지 일부만 열거한 것이다.
- [0194] 상기 조성물들은 임의의 적절한 제형으로 피검자에게 투여될 수 있다. CoQ10의 국소 제형으로 중앙을 치료하는 것 외에, 본 발명의 다른 측면들에서, CoQ10은 다른 방법들로 전달될 수도 있다. 예를 들면, CoQ10은 비경구적 전달을 위해, 예를 들면 피하, 정맥내, 근육내 또는 중앙내 주사를 위해 제형될 수도 있다. 다른 전달 방법들, 예를 들면 본원 조성물과 혼합된 기기로부터 리포솜 전달 또는 확산이 사용될지도 모른다. 이 조성물은 단일회

거환, 다중회 주사 또는 연속 주사(예를 들면, 정맥내 또는 복강 투석에 의해)에 의해 투여될 수 있다. 비경구적 투여를 위해, 이 조성물들은 멸균된 무발열원 형태로 제형되는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물들은 세포가 함유된 유체에 조성물을 단순히 부가함으로써(예를 들면, 시험관 내 배양물의 중앙 세포에서 세포 사멸을 유도하기 위해) 세포에 시험관 내로 투여될 수도 있다.

[0195] 주사를 위해, 본 발명의 약제들은 수용액으로, 바람직하게는 헵크 액, 링거 액 또는 생리적 염수 완충액 등의 생리학상 적합한 완충액들로 제형될 수 있다. 그러한 경점막 투여를 위해, 통과되는 장벽에 적합한 침투제가 제형 내에 사용될 수 있다. 그러한 침투제들은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0196] 전신 투여에 적절한 복용량들로 본 발명을 실시하기 위해 본원에 개시된 화합물들을 제형화하기 위한 약제학상 허용되는 담체들의 사용은 본 발명의 범위 내이다. 담체의 적절한 선택 및 적절한 제조 방법에 따라, 본 발명의 조성물들, 특히 용액으로 제형화된 것들은 비경구적으로, 예를 들면 정맥내 주사로 투여될 수 있다. 이 화합물들은 경구 투여에 적절한 복용량들로 당업계에 잘 공지된 제약학상 허용되는 담체들을 사용하여 용이하게 제형화될 수 있다. 치료받을 환자의 경구 소화를 위해, 그러한 담체들은 본 발명의 화합물들을 정제, 필, 캡슐제, 액상제, 겔제, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화될 수 있게 한다.

[0197] 세포내로 투여되도록 의도된 약제들은 당업계의 당업자들에게 잘 공지된 기술들을 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 그러한 약제들은 리포솜으로 캡슐화될 수 있고, 상기한 바와 같이 투여될 수 있다. 리포솜들은 수성 내부를 갖는 구상 액체 2층 구조이다. 리포솜 제형과 동시에 수용액에 존재하는 모든 분자들은 수성 내부 내로 혼입된다. 리포솜 함량들은 모두 외부 미생물 환경으로부터 보호되고, 리포솜들은 세포막들과 융합되기 때문에, 세포질 내로 효율적으로 전달된다. 추가로, 이들의 소수성으로 인해, 작은 유기 분자들이 세포내로 직접적으로 투여될 수 있다.

[0198] 본 발명에 사용하기 적절한 약제학적 조성물들은 그의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 활성 성분들을 함유하는 조성물들을 포함한다. 그 유효량의 결정은 당업자들의 능력 하에서, 특히 본원에 제공된 상세한 개시 내용에 비추어 이루어진다. 활성 성분에 추가하여, 이들 약제학적 조성물들은 활성 화합물들을 가공하여 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로 가능하게 만드는, 부형제들 및 보조제들을 포함하는 적절한 약제학적으로 허용되는 담체들을 함유할 수 있다. 경구 투여를 위해 제형화된 제제들은 정제, 당의정, 캡슐제 또는 용액제의 형태일 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 예를 들면 종래의 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 압축, 유화, 캡슐화, 트랩화 또는 친액화 공정에 의해 자체 공지된 방식으로 제조될 수 있다.

[0199] 국소 투여에 적절한 제형들은 피부를 통해 치료가 필요한 부위에 침투시키기 적절한 액상 또는 반액상 제제들, 예를 들면 도포제, 로션, 크림, 연고 또는 페이스트들 및 눈, 귀 또는 코에 투여하기 적절한 점적제들을 포함한다. 본 발명에 따른 점적제들은 멸균 수용액 또는 유성 용액 또는 현탁액들을 포함하고, 살균제 및/또는 살진균제 및/또는 임의의 기타 적절한 보존제의 적절한 수용액, 그리고 바람직하게는 표면 활성제를 포함하는 수용액에 활성 성분을 용해시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 결과적인 용액은 여과에 의해 투명해지고 멸균될 수 있으며, 무균 기술에 의해 용기로 옮겨질 수 있다. 점적제에 포함시키기 적절한 살균제 및 살진균제의 예는 페닐수은 나이트레이트 또는 아세테이트(0.002%), 벤잘코늄 클로라이드(0.01%) 및 클로헥시딘 아세테이트(0.01%)이다. 유상 용액의 제조에 적절한 용매들로는 글리세롤, 희석 알콜 및 프로필렌 글리콜을 들 수 있다.

[0200] 본 발명에 따른 로션제는 피부 또는 눈에 적용하기 적절한 것들을 포함한다. 안약은 임의로 살균제를 함유하는 멸균 수용액을 포함할 수 있고, 점적제를 제조하기 위한 것들과 유사한 방법들에 의해 제조될 수 있다. 피부에 도포하기 위한 로션 또는 도포제는 예를 들면 알코올 또는 아세톤과 같은 피부의 건조 또는 냉각을 촉진시키는 시약 및/또는, 예를 들면 글리세롤과 같은 보습제 예를 들면 피마자유 또는 아라키스(arachis) 오일과 같은 오일을 포함할 수도 있다.

[0201] 본 발명에 따른 크림, 연고 또는 페이스트들은 외부 도포를 위해 활성 성분의 반-고체 제형들이다. 이들은 미세-분할되거나 또는 분쇄된 형태의 활성 성분을 단독으로 또는 적절한 기계의 도움으로 수성 또는 비-수성 유체 중의 용액 또는 현탁액 중에서 지방질 또는 비-지방질 베이스들과 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이 베이스들은 경질, 연질 또는 액상 파라핀, 글리세롤, 밀랍, 금속성 비누 등의 탄화수소; 아교; 아몬드, 옥수수, 아라키 오일, 피마자유 또는 올리브 오일 등의 천연물 기원 오일; 양모지 또는 그의 유도체, 또는 스테아르산 또는 올레산 등의 지방산을 프로필렌 글리콜 또는 마크로겔 등의 알코올과 함께 포함할 수 있다. 이 제형은 소르비탄 에스테르들 또는 그의 폴리옥시에틸렌 유도체들과 같은 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 표면 활성제 등의 임의의 적절한 표면 활성제를 혼입시킬 수 있다. 현탁제들, 예를 들면 천연 검, 셀룰로스 유도체 또는 무기 미네랄, 예를 들면 규소질성(siliceous) 실리카 및 기타 성분들, 예를 들면 라놀린이 포함될 수도 있다.

- [0202] 비경구 투여를 위한 약제학적 제형들은 수용성 형태로 활성 화합물들의 수용액들을 포함한다. 추가로, 활성 화합물들의 현탁액들은 적절한 유상 주사 현탁액들로 제조될 수 있다. 적절한 호지성 용매들 또는 비히클들은 지방 오일들, 예를 들면 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르들, 예를 들면 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드들 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액들은 현탁액의 점도를 증가시키는 기질들, 예를 들면 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 이 현탁액은 고도로 농축된 용액들의 제조를 허용하도록 화합물들의 용해도를 증가시키는 적절한 안정제들 또는 시약들을 함유할 수도 있다.
- [0203] 경구용으로 사용하기 위한 약제학적 제제들은 활성 화합물들을 고체 부형제와 조합하고, 임의로 결과적 혼합물을 분쇄하고, 필요할 경우 적절한 보조제들을 부가한 후 과립들의 혼합물들을 가공함으로써 정제 또는 당의정 코어들을 얻을 수 있다. 적절한 부형제들은 특히 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당 등의 충전제; 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트라가칸쓰, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 소듐 카르복시-메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 등의 셀룰로오스 제제들이다. 필요한 경우, 붕해제들, 예를 들면 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 한천 또는 알긴산 또는 그의 염, 예를 들면 알긴산 나트륨이 첨가될 수 있다.
- [0204] 당의정 코어들은 적절한 코팅에 의해 제공된다. 이러한 목적으로, 임의로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 이산화 티탄, 래커(lacquer) 용액 및 적절한 유기 용매 또는 용매 혼합물들을 함유할 수 있는 농축된 당 용액들이 사용될 수 있다. 염료 또는 안료들이 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 식별하거나 특징짓기 위해 정제 또는 당의정 코팅들에 부가될 수 있다.
- [0205] 경구로 사용될 수 있는 약제학적 제제들은 젤라틴으로 제조된 푸쉬-피트 캡슐 뿐만 아니라 젤라틴 및 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제로 제조된 봉합된 캡슐을 포함한다. 푸쉬-피트 캡슐은 락토오스 등의 충전제, 전분 등의 결합제 및/또는 탈크 또는 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제들 및 임의로 안정제들과의 혼합물로서 활성 성분들을 함유할 수 있다. 연결 캡슐들에서, 활성 화합물들은 지방성 오일들, 액상 파라핀 또는 액상 폴리에틸렌 글리콜들 등의 적절한 액체들 중에 용해 또는 현탁될 수 있다. 또한, 안정제들이 부가될 수 있다.
- [0206] 조성물은 필요할 경우 완충 시스템을 포함할 수 있다. 완충 시스템들은 목적 범위 내에서 조성물들의 pH를 유지하거나 또는 완충시키도록 선택된다. 본원에 사용된 바의 "완충 시스템" 또는 "완충액"은 수용액 중에서, 산 또는 염기가 그에 부가될 때 pH(또는 수소 이온 농도 또는 활성)의 주요 변화에 반하여 그러한 용액을 안정시킬 수 있는 용질 시약 또는 시약들을 의미한다. 상기 지시된 범위에서 시작하는 완충된 pH 값으로부터 pH의 변화 또는 저항에 책임이 있는 용질 시약 또는 시약들은 잘 공지되어 있다. 수많은 적합한 완충액들이 있지만, 인산 칼륨 일수화물이 바람직한 완충액이다.
- [0207] 약제학적 조성물의 최종 pH 값은 생리학상 적합한 범위 내에서 변화할 수 있다. 필연적으로, 최종 pH 값은 인간의 피부를 자극하지 않는 것이고, 바람직하게는 활성 화합물, 즉, CoQ10의 경피 수송을 가능하게 한다. 이러한 구속 요건을 위반하지 않으면서, pH는 CoQ10 화합물의 안전성을 개선시키고, 필요할 때, 일관성(consistency)을 조절하기 위해 선택될 수 있다. 일 실시 양태에서, 바람직한 pH 값은 약 3.0 내지 7.4, 더욱 바람직하게는 약 3.0 내지 약 6.5, 가장 바람직하게는 약 3.5 내지 약 6.0이다.
- [0208] 바람직한 국소 전달 비히클들에 대해, 조성물의 나머지 성분은 반드시 정제된 물, 예를 들면 탈이온수이다. 그러한 전달 비히클 조성물들은 조성물의 총 중량에 기초하여 약 50% 내지 약 95% 범위의 물을 함유한다. 존재하는 물의 특정량은 중요하지 않지만, 다른 성분들의 목적하는 점도(보편적으로 약 50 cps 내지 약 10,000 cps) 및/또는 농도를 얻기 위해 조절될 수 있는 것이다. 국소 전달 비히클은 바람직하게는 적어도 약 30 센티포이즈의 점도를 갖는다.
- [0209] 다른 공지된 경피 피부 침투 증진제들은 CoQ10의 전달을 촉진시키기 위해 사용될 수도 있다. 디메틸설폭사이드(DMSO)등의 설폭사이드들; 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온(AZONETM, Nelson Research, Inc.의 등록 상표) 등의 사이클릭 아미드들; N,N-디메틸 아세트아미드(DMA), N,N-디에틸 톨루아미드, N,N-디메틸 포르미아미드, N,N-디메틸 옥타미드, N,N-디메틸 데카미드 등의 아미드들; N-메틸-2-피롤리돈, 2-피롤리돈, 2-피롤리돈-5-카르복시산, N-(2-히드록시에틸)-2-피롤리돈 또는 그의 지방산 에스테르, 1-라우릴-4-메톡시카르보닐-2-피롤리돈, N-탈로일 킬피롤리돈 등의 피롤리돈 유도체들; 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 글리세롤, 헥산트리올 등의 폴리올들; 올레산, 라우르산, 발레산, 헵타노산, 카프로산, 미리스탄산, 이소발레산, 네오펀타노산, 트리메틸 헥사노산, 이소스테아르산 등의 선형 및 분지된 지방산들; 에탄올, 프로판올, 부탄올, 옥탄올, 올레일, 스테아릴, 리놀레일 등의 알코올; 소듐 라우레이트, 소듐 라우릴 설페이트 등의 양이온성 계면활성제; 벤잘코늄 클로라이드, 도데실트리메틸암모늄 클로라이드, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드

등의 음이온성 계면활성제들; 프로폭실화된 폴리옥시에틸렌 에테르, 예, 폴록사머 231, 폴록사머 182, 폴록사머 184 등, 에톡시화된 지방산, 예 트윈 20, 미르지 45 등; 소르비탄 유도체들, 예 트윈 40, 트윈 60, 트윈 80, 스펀 60 등, 에톡시화된 알코올, 예 폴리에틸렌(4) 라우릴 에테르(Brij 30), 폴리옥시에틸렌(2) 올레일 에테르(Brij 93) 등, 레시틴 및 레시틴 유도체 등의 비이온성 계면활성제; D-리모넨, α-피넨, β-카렌, α-테르피네올, 카르볼, 카르본, 멘톤, 리모넨 산화물, α-피넨 산화물, 유칼립투스 오일 등의 테르펜들이 예시된다. 피부 침투 증진제로서 유기산 및 에스테르들, 예를 들면 살리실산, 메틸 살리실레이트, 시트르산, 숙신산 등이 또한 적절하다.

[0210] 일 실시양태에서, 본 발명은 CoQ10 조성물 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 조성물은 적어도 약 1% 내지 약 25% CoQ10 w/w를 포함한다. CoQ10은 UBIDECARENONE (USP)로서 Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japan)으로부터 얻을 수 있다. CoQ10은 또한 분말 형태로, Kaneka Q10 (USP UBIDECARENONE)로서 Kaneka 10으로부터 얻을 수 있다(Pasadena, Texas, USA). 본원에서 예시된 방법 내에서 사용되는 CoQ10은 다음의 특징을 지닌다: 잔존 용매는 USP 467의 요구 조건을 만족한다: 물 함량은 0.0% 미만, 0.05% 미만, 또는 0.2% 미만이다; 강열 잔류물은 0.0%, 0.05% 미만, 또는 0.2% 미만이다; 중금속 함량은 0.002% 미만 또는 0.001% 미만이다; 98 내지 100% 또는 99.9% 또는 99.5% 사이의 순도. 조성물을 제조하는 방법은 하기 실시예 부분에서 제공된다.

[0211] 본 발명에 따른 특정 실시양태에서, 치료 또는 예방이 되도록 인간에게 조효소 Q10을 국소적으로 투여하는, 인간 내 종양학적 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하는데, 여기서 인간은 조효소 국소 비허클 내 Q10의 국소 용량을 투여받으며, 조효소 Q10은 피부의 제곱센티미터 당 조효소 Q10 약 0.01 내지 0.5mg 범위로 대상 조직에 적용된다. 일 실시양태에서, 조효소 Q10은 피부의 제곱센티미터 당 조효소 Q10 약 0.09 내지 0.15 mg 범위로 대상 조직에 적용된다. 다양한 실시양태에서, 조효소 Q10은 피부 제곱센티미터 당 약 0.001 내지 약 5.0, 약 0.005 내지 약 1.0, 약 0.005 내지 약 0.5, 약 0.01 내지 약 0.5, 약 0.025 내지 약 0.5, 약 0.05 내지 약 0.4, 약 0.05 내지 약 0.30, 약 0.10 내지 약 0.25, 또는 약 0.10 내지 0.20 mg CoQ10의 범위로 대상 조직에 적용된다. 다른 실시양태에서, 조효소 Q10은 피부 제곱센티미터 당 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49 또는 0.5 mg의 CoQ10의 양으로 대상 조직에 적용된다. 일 실시양태에서, 조효소 Q10은 피부 제곱센티미터 당 약 0.12 mg의 CoQ10의 양으로 대상 조직에 적용된다. 이들 값 중 어느 하나를 상한 또는 하한값으로 갖는 범위, 예를 들어 피부의 제곱 센티미터당 약 0.03 내지 약 0.12, 약 0.05 내지 약 0.15, 약 0.1 내지 약 0.20, 또는 약 0.32 내지 약 0.49 mg의 CoQ10 역시 본 발명의 일부로서 의도된 것임을 이해하여야 한다.

[0212] 본 발명의 또 다른 실시양태로, 조효소 Q10은 피부 제곱센티미터당 CoQ10의 0.5 내지 10 밀리그램의 양으로, CoQ10 크림의 형태로 투여되는데, 여기서 CoQ10 크림은 조효소 Q10의 1 내지 5% 사이를 포함한다. 일 실시양태에서, CoQ10 크림은 조효소 Q10의 약 3%를 포함한다. 다른 실시양태에서, CoQ10 크림은 조효소 Q10의 약 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5%를 포함한다. 다양한 실시양태에서, CoQ10 크림은 피부 제곱센티미터당 CoQ10 크림의 약 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 또는 10 밀리그램의 양으로 투여된다. 이들 값 중 어느 하나를 상한 또는 하한값으로 갖는 범위, 예를 들어 피부의 제곱 센티미터당 약 0.5 내지 약 5.0, 약 1.5 내지 2.5, 또는 약 2.5 내지 5.5 mg 사이의 CoQ10 크림 역시 본 발명의 일부로서 의도된 것임을 이해하여야 한다.

[0213] 또 다른 실시양태로서, 조효소 Q10은 CoQ10 크림의 형태로, 피부 제곱센티미터 당 3 내지 5 밀리그램 사이로 투여되는데, 여기서 CoQ10 크림은 조효소 Q10의 약 1 내지 5% 사이를 포함한다. 일 실시양태로, CoQ10 크림은 조효소 Q10의 약 3%를 포함한다. 다른 실시양태로, CoQ10 크림은 조효소 Q10의 약 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5%를 포함한다. 다양한 실시양태로서, CoQ10 크림은 피부 제곱센티미터당 CoQ10 크림의 약 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0 밀리그램의 양으로 투여된다. 이들 값 중 어느 하나를 상한 또는 하한값으로 갖는 범위, 예를 들어 피부의 제곱 센티미터당 약 3.0 내지 약 4.0, 약 3.3 내지 5.3, 또는 약 4.5 내지 4.9 mg 사이의 CoQ10 크림 역시 본 발명의 일부로서 의도된 것임을 이해하여야 한다.

[0214] 본 발명의 특정 측면은 치료 또는 예방이 되도록 인간에게 조효소 Q10을 국소적으로 투여하는, 인간 내 종양학적 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하는데, 여기서 조효소 Q10은 국소적을 6주 이상의 기간 동안 24시간 당 한 회 이상 국소적으로 적용된다.

- [0215] 본 발명의 특정 측면은 상 A, B, C, D 및 E를 제조하는 단계 및 이들 상을 조합하여, CoQ10 크림의 3% 수-중-유 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는, 조효소 Q10 크림 3%를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0216] 어떤 실시양태에서, 여기 개시된 MIM 및 epi-전환인자는 식이 보충제로 통상적으로 사용되는 것들을 제외한다. 어떤 실시양태에서, 이러한 여기 개시된 MIM 및/또는 epi-전환인자는 의약품 등급이다. 어떤 실시양태에서, 의약품 등급의 MIM 및/또는 epi-전환인자는 약 95% 및 약 100% 사이의 순도를 가지며 95% 및 100% 사이의 모든 값을 포함한다. 어떤 실시양태에서, MIM 및/또는 epi-전환인자의 순도는 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 99.9 또는 100%이다. 어떤 실시양태에서, MIM 및/또는 epi-전환인자는 내독소(endotoxin)이 없다. 다른 실시양태에서, MIM 및/또는 epi-전환인자는 외부 단백질 물질이 없다. 어떤 실시양태에서, MIM 및/또는 epi-전환인자는 CoQ10이다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 상 A 성분은 4.00 %w/w의 C<sub>12-15</sub>알킬 벤조에이트 NF, 2.00% w/w의 세틸 알코올 NF, 4.5%w/w의 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 및 1.50%w/w의 스테아릴 알코올 NF 를 함유하며, 상 B 성분은 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 2.00 %w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP 및 40%w/w의 카보머 분산액 2%를 함유하고, 상 C 성분은 0.50%w/w의 젖산 USP, 2.00%w/w의 젖산 나트륨 용액 USP, 1.30%w/w의 트롤아민 NF 및 2.50%w/w의 정제수 USP를 함유한다. 추가로 이들 실시 양태에서, 상 D 성분은 1.00%w/w의 티타늄 디옥사이드 USP를 함유하고 상 E 성분은 15%w/w의 CoQ10 21%의 농도를 함유한다.
- [0218] 특정 다른 실시 양태에서, 상 A 성분은 4.0%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.00%w/w의 세틸 알코올 NF, 4.5%의 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 및 1.5%w/w의 스테아릴 알코올 NF를 함유하며, 상 B 성분은 5.00%w/w의 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 2.00%w/w의 글리세린 USP, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜 USP, 0.475%w/w의 페녹시에탄올 NF, 16.725%w/w의 정제수 USP 및 40.00%w/w의 카보머 분산액 2%를 함유하고, 상 C 성분은 0.50%w/w의 젖산 USP, 2.00%w/w의 젖산 나트륨 용액 USP, 1.30%w/w의 트리에탄올아민 NF 및 2.50%w/w의 정제수 USP를 함유한다. 추가로, 이들 실시 양태에서, 상 D 성분은 1.00%w/w의 티타늄 디옥사이드 USP를 함유하고, 상 E 성분은 15%w/w의 CoQ10 21%의 농도를 함유한다.
- [0219] 본 발명의 특정 실시 양태에서, CoQ10 크림 3%를 제조하기 위한 방법을 제공하는데, 이들 방법은 다음의 단계: (1) 상 A 성분이 적절한 용기에 첨가되어 수조 내에서 70 내지 80°C로 가열되며; (2) 카보머 분산액을 포함하지 않는 상 B 성분이 적절한 용기에 첨가되고 혼합되어, 혼합된 상 B를 형성하고; (3) 상 E 성분이 적절한 용기에 배치되어 수조를 사용하여 50 내지 60°C에서 녹여, 녹은 상 E를 형성하고; (4) 카보머 분산액이 혼합 탱크에 첨가되어 혼합과 함께 70 내지 80°C로 가열되며; (5) 70 내지 80°C를 유지하면서 혼합된 상 B가 상기 혼합 탱크에 첨가되고; (6) 70 내지 80°C를 유지하면서 상 C 성분이 상기 혼합 탱크에 첨가되며; (7) 상 D 성분은 상기 혼합 탱크에 첨가되어 혼합 및 균질화되고; 이후 (8) 균질화를 중지하고 혼합 탱크의 내용물을 50 내지 60 °C로 냉각하며; (9) 혼합을 중단하고 녹은 상 E를 상기 혼합 탱크에 첨가하여 분산액을 형성하고; (10) 분산액이 부드러워지고 균일해질 때까지 혼합을 재개하며; (11) 상기 혼합 탱크의 내용물을 45 내지 50°C로 냉각하는 단계를 포함한다.
- [0220] 본 발명의 일부 다른 실시 양태에서, CoQ10 크림 3%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 크림은 조성물에 대한 4.00%w/w의 C<sub>12-15</sub>알킬 벤조에이트, 조성물에 대한 2.00%w/w의 세틸 알코올, 1.50%w/w의 스테아릴 알코올, 4.5%w/w의 글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100을 함유하는 상 A 성분, 2.00%w/w의 글리세린, 1.50%w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0%w/w의 에톡시디글리콜, 0.475%w/w의 페녹시에탄올, 40%w/w의 카보머 분산액 및 16.725%w/w의 정제수를 함유하는 상 B 성분, 1.300%w/w의 트리에탄올아민, 0.500%w/w의 젖산, 2.000%w/w의 젖산 나트륨 용액, 2.5%w/w의 물을 함유하는 상 C 성분, 1.000%w/w의 티타늄 디옥사이드를 함유하는 상 D 성분 및 15.000%w/w의 CoQ10 21%의 농도를 함유하는 상 E 성분을 함유한다. 일부 실시 양태에서, 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜 및 카보머 940을 함유한다.
- [0221] 본 발명의 어떤 다른 실시양태에서, CoQ10 크림 3%를 함유하는 약학적 조성물이 제공된다. 이 크림은 조성물의 4.00%w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드, 2.00 %w/w의 세틸 알코올, 1.5 %w/w의 스테아릴 알코올, 글리세릴 스테아레이트 및 4.5 %w/w의 PEG-100를 갖는 상 A; 2.00 %w/w의 글리세린, 1.5 %w/w의 프로필렌 글리콜, 5.0 %w/w의 에톡시디글리콜, 0.475 %w/w의 페녹시에탄올, 40.00 %w/w의 카보머 분산액, 16.725 %w/w의 정제수를 갖는 상 B; 1.300 %w/w의 트리에탄올아민, 0.500 %w/w의 락트산, 2.000 %w/w의 소듐 젖산 용액, 2.5 %w/w의 물을 갖는 상 C; 1.000 %w/w의 티타늄 디옥사이드를 갖는 상 D; 및 15.000 %w/w의 CoQ10 21% 농도를 갖는 상 E을

포함한다. 어떤 실시양태에서, 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜 및 카보머 940을 포함한다.

[0222] 본 발명의 어떤 특정 실시양태에서, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 크림은 5.000 %w/w의 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트, 2.000 %w/w의 세틸 알코올, 1.5 %w/w의 스테아릴 알코올, 4.500 %w/w의 글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트를 갖는 상 A; 2.000 %w/w의 글리세린, 1.750 %w/w의 프로필렌, 5.000 %w/w의 에톡시디글리콜, 0.463 %w/w의 페녹시에탄올, 50 %w/w의 카보머 분산액, 그리고 11.377 %w/w의 정제수를 갖는 상 B; 1.3 %w/w의 트리에탄올아민, 0.400 %w/w의 락트산, 2.000 %w/w 소듐 젯산 용액, 그리고 4.210 %w/w의 물을 갖는 상 C; 1.000 %w/w의 이산화티타늄을 갖는 상 D; 및 1.500 %w/w의 CoQ10 21% 농도를 갖는 상 E를 포함한다.

[0223] 본 발명의 어떤 특정 실시양태에서, CoQ10 크림 1.5%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 5.000 %w/w의 카프릭/카프릴릭 트리글리세리드, 2.000 %w/w의 세틸 알코올, 1.5 %w/w의 스테아릴 알코올, 4.500 %w/w의 글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트를 갖는 상 A; 2.000 %w/w의 글리세린, 1.750 %w/w의 프로필렌, 5.000 %w/w의 에톡시디글리콜, 0.463 %w/w의 페녹시에탄올, 50 %w/w의 카보머 분산액, 그리고 11.377 %w/w의 정제수를 갖는 상 B; 1.3 %w/w의 트리에탄올아민, 0.400 %w/w의 락트산, 2.000 %w/w의 소듐 젯산 용액, 그리고 4.210 %w/w의 물을 갖는 상 C; 1.000 %w/w의 이산화티타늄을 갖는 상 D; 및 1.500 %w/w의 CoQ10 21% 농도를 갖는 상 E를 포함한다. 특정 실시양태에서 카보머 분산액은 물, 페녹시에탄올 및 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0224] **1. 배합 치료**

[0225] 특정 실시 양태에서, CoQ10 및/또는 이의 약제학적 조성물은 적어도 하나의 다른 치료학적 약제와 함께 배합 치료에서 사용될 수 있다. CoQ10 및/또는 이의 약제학적 조성물 및 다른 치료학적 약제는 추가적으로 또는, 보다 바람직하게는 상승작용적으로 작용할 수 있다. 하나의 실시 양태에서, CoQ10 및/또는 이의 약제학적 조성물은 또 다른 치료학적 약제의 투여와 함께 동시에 투여된다. 또 다른 실시 양태에서, 화합물 및/또는 이의 약제학적 조성물은 또 다른 치료학적 약제의 투여 전 또는 후에 투여된다.

[0226] 일 실시양태에서, 본 발명의 치료방법은 첨가제를 포함한다. 예를 들면, 일 실시양태에서, 본 발명의 치료방법에 사용되기 위한 첨가제는 화학치료제이다.

[0227] 화학치료제는 일반적으로 다양한 클래스에 속하는데, 예를 들면 1. 토포아이스머라아제 II 저해제 (세포독성 항생제), 예컨대 안트라사이클린/안트라센디온, 예를 들면 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 네모루비신, 안트라퀴논류, 예를 들면 미토잔트론(mitoxantrone) 및 로소잔트론(loxoxantrone) 및 포도필로톡신류, 예를 들면 에토포사이드 및 테니포사이드; 2. 마이크로튜블 형성에 영향을 주는 약제(미토틱 저해제), 예컨대 식물성 알칼로이드 (예를 들면, 생물학적으로 활성있고 세포독성이 있는 식물로부터 유래한 알칼라인 패밀리, 질소-함유 분자에 속하는 화합물), 예를 들면 탁세인(taxanes), 예를 들면 파클리탁센 및 도세탁셀, 그리고 빈카 알칼로이드류, 예를 들면 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈(vinorelbine) 및 포도필로톡신의 유도체; 3. 알킬화제, 예컨대 질소 머스타드, 에틸렌이민 화합물, 알킬 설포네이트 및 기타 알킬화 작용을 하는 화합물, 예를 들면 나이트로소유리아, 디카르바진(dacarbazine), 사이클로포스파미드, 이포스파미드 및 멜팔란(melphalan); 4. 항대사제 (뉴클레오시드 저해제), 예를 들면, 플레이트, 예를 들면 폴산, 피우로피리미딘(fiuropyrimidines), 퓨린 EH는 피리미딘 아날로그, 예컨대 5-플루오로우라실, 카페시타빈(capecitabine), 겐시타빈(gemcitabine), 메토트렉세이트 및 에다트렉세이트; 5. 토포아이스머라아제 I 저해제, 예컨대 토포테칸, 이리노테칸, 그리고 9-니트로캄토테신 및 캄토테신 유도체; 및 6. 백금 화합물/복합체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴, 그리고 카르보플라틴을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되기 위한 예시적 화학치료제로는, 이로 제한되는 것은 아니나, 아미포스틴(에티올), 시스플라틴, 디카르바진(DTIC), 닥티노마이신, 메클로에타민(질소 머스타드), 스트렙토조신, 사이클로포스파미드, 카르누스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 독소루비신(아드리아마이신), 독소루비신 리포(독실), 겐시타빈(gemzar), 다우노루비신, 다우노루비신 리포(다우녹숨), 프로카르바진, 미토마이신, 시타라빈, 에토포사이드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 (5-FU), 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 파클리탁센(탁솔), 도세탁셀(탁소테르), 알데스루킨(aldesleukin), 아스파라기나아제, 부숄판(busulfan), 카르보플라틴, 클라드리빈, 캄토테신, CPT-11, 10-히드록시-7-에틸-캄토테신(SN38), 디카르바진(dacarbazine), S-I 카페시타빈(capecitabine), 프토라푸르(ftorafur), 5' 데옥시플루오로우리딘, UFT, 에닐우라실, 데옥시사이티딘(deoxycytidine), 5-아자사이토신, 5-아자데옥시사이토신, 알로퓨리놀, 2-클로로 아데노신 트리메트렉세이트(trimetrexate), 아미노프테린, 메틸렌-10-데아자아미노프테린(MDAM), 옥사플라틴(oxaplatin), 피코플라틴(picoplatin), 테트라플라틴(tetraplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 백금-DACH, 오르마플라틴(ormaplatin), CI-973, JM-216, 그리고 이들의 아날로그, 에피루비신, 에토포사이드 포스페이트, 9-아미노 캄토



테신, 10, 11-메틸렌디옥시캄토테신, 카레니테신, 9-니트로캄토테신, TAS 103, 빈테신, L-페닐알라닌 머스타드, 이포스파미드메포스파미드( ifosphamidemefosphamide), 퍼포스파미드(perfosfamide), 트로포스파미드 카르무스틴(trophosphamide carmustine), 세무스틴(semustine), 에포틸론(epothilones) A-E, 토무덱스(tomodex), 6-머캄토포린, 6-티오구아닌, 암사크린(amsacrine), 에토포시드 포스페이트(etoposide phosphate), 카레니테신(karenitecin), 아시클로비어(acyclovir), 발아시클로비어(valacyclovir), 간시클로비어(ganciclovir), 아만타딘(amantadine), 리만타딘(rimantadine), 라미부딘(lamivudine), 지도부딘(zidovudine), 베바시주맙(bevacizumab), 트라스투주맙(trastuzumab), 리툭시맙(rituximab), 5-플루오로우라실, 카페시타빈(Capecitabine), 펜토스타틴(Pentostatin), 트리메트렉세이트(Trimetrexate), 클라드리빈(Cladribine), 플록스유리딘, 플루다라빈(fludarabine), 히드록시유리아, 이포스파미드(ifosfamide), 이다루비신(idarubicin), 메스나(mesna), 이리노테칸(irinotecan), 미토잔트론(mitoxantrone), 토포테칸(topotecan), 루프롤리드(leuprolide), 메제스트롤(megestrol), 멜팔란(melphalan), 머캄토포린, 플리카마이신(plicamycin), 미토테인, 페가스파르가아제(pegaspargase), 펜토스타틴(pentostatin), 피포브로만(pipobroman), 플리카마이신(plicamycin), 스트렙토조신(streptozocin), 타목시펜(tamoxifen), 테니포사이드(teniposide), 테스토락톤(testolactone), 티오구아닌, 티오테파, 우라실 머스타드, 비노렐빈(vinorelbine), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 독소루비신(doxorubicin), 파클리탁셀(taxol) 및 블레오마이신, 그리고 이들의 조합을 포함하며, 특정 종양 또는 암의 케어에 적절한 표준에 기초할 때 이 기술분야의 기술자에게 용이하게 명백하다.

[0228] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 배합 치료에 사용되기 위한 추가적 약제는 생물학적 약제이다.

[0229] (또한 생물제제라고도 불리는) 생물학적 약제는 생물학적 시스템, 예컨대 유기체, 세포 또는 재조합 시스템으로부터의 산물이다. 이러한 생물학적 약제의 예로 핵산 분자(예를 들면 안티센스 핵산 분자), 인터페론, 인터루킨, 콜로니-촉진 인자, 항체, 예를 들면 모노클로날 항체, 항-신생혈관생성제, 그리고 사이토카인을 포함한다. 예시적 생물학적 약제에 대해서는 하기에서 보다 상세히 설명되며, 일반적으로 다양한 클래스가 속하는데, 예를 들면: 1. 호르몬제, 호르몬성 아날로그, 그리고 호르몬성 복합제, 예컨대 에스트로젠 및 에스트로젠 아날로그, 프로게스테론, 프로게스테론 아날로그 및 프로게스틴, 안드로젠, 아드레노코르티코스테로이드, 안티에스트로젠, 안티안드로젠, 안티테스토스테론, 아드레날 스테로이드 저해제, 그리고 항-황체호르몬(leuteinizing hormones); 및 2. 효소류, 단백질, 펩티드, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체, 예컨대 인터루킨, 인터페론, 콜로니 촉진 인자 등을 포함한다.

[0230] 일 실시양태에서, 생물제제는 인터페론이다. 인터페론(IFN)은 신체에서 자연발생적으로 생기는 형태의 생물학적 약제이다. 인터페론은 또한 실험실에서 생산될 수도 있으며, 암 환자의 생물학적 치료에 있어 사용된다. 이들은 암 환자의 암 세포에 대한 면역 시스템 활동을 향상시키는 것으로 보인다.

[0231] 인터페론은 암세포에 직접 작용하여 암세포의 성장을 늦출 수 있거나, 암세포가 보다 정상의 특징을 갖는 세포로 변화하도록 할 수 있다. 어떤 인터페론은 암세포에 대항해 싸우는 것을 도와주는 혈류에 있는 백혈구 세포 타입인 자연살해세포(NK 세포), T 세포 및 마크로파지를 촉진할 수 있다.

[0232] 일 실시양태에서, 생물제제는 인터루킨이다. 인터루킨(IL)은 많은 면역 세포의 성장 및 활성을 촉진시킨다. 그들은 신체에서 자연발생적으로 생기는 단백질들(사이토카인 및 케모카인)이나, 실험실에서 만들어질 수도 있다.

[0233] 어떤 인터루킨은 암세포를 파괴하는 작용을 하는 림프구(lymphocyte)와 같은 면역 세포의 성장 및 활성을 촉진시킨다.

[0234] 또 다른 실시양태에서 생물제제는 콜로니-촉진 인자이다.

[0235] 콜로니-촉진 인자(CSFs)는 환자에게 투여되었을 때 골수내 줄기세포를 자극하여 더 많은 혈액세포를 생성시키는 단백질이다. 신체는 특히 암이 존재할 때 끊임없이 새로운 백혈구, 적혈구, 그리고 혈소판을 필요로 한다. 화학치료와 함께 CSF를 투여하면, 면역 시스템을 부스팅하는 것을 도울 수 있다. 암 환자가 화학치료를 받을 때, 골수의 새로운 혈액세포 생성 능력이 떨어지고, 환자에게 더욱 감염이 잘 발생하게 만든다. 면역 시스템 부분은 혈액 세포 없이 기능할 수 없으며, 따라서 콜로니-촉진 인자는 골수 줄기세포를 자극하여, 백혈구, 혈소판 및 적혈구를 생산한다.

[0236] 적절한 세포 생성과 함께, 다른 암 치료법은 환자가 안전하게 더 높은 용량의 화학치료를 연속적으로 받을 수 있도록 해준다.

[0237] 또 다른 실시양태에서, 생물제제는 항체이다. 항체는, 예컨대 모노클로날 항체가, 실험실에서 생성되는, 약제이

며, 암 세포에 결합한다.

- [0238] 암-과괴 약제가 신체에 도입될 때, 이들은 항체를 찾아내고, 암 세포를 죽인다. 모노클로날 항체 제제는 건강한 세포를 파괴하지 않는다. 모노클로날 항체는 다양한 메커니즘을 통해 치료효과를 나타낸다. 그들은 아포토시스 또는 프로그램된 세포 죽음을 야기하여 직접 효과를 나타낼 수 있다. 그들은 성장인자 수용체를 막아, 종양 세포의 증식을 효과적으로 막을 수 있다. 모노클로날 항체를 발현하는 세포에서, 그들은 항 이디오타입 항체 형성을 야기할 수 있다.
- [0239] 본 발명의 배합 치료에 사용될 수 있는 항체의 예로 항-CD20 항체, 예컨대 이로 제한되는 것은 아니나, 세투시맵(cetuximab), 토시투모맵(Tositumomab), 리투시맵(rituximab) 및 이브리모맵(Ibritumomab)을 포함한다. 항-HER2 항체는 암의 치료를 위해 환경 영향인자와 배합되어 사용될 수도 있다. 일 실시양태에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맵(Trastuzumab, Herceptin)이다. 암 치료를 위해 환경 영향인자와 배합되어 사용될 수 있는 다른 항체의 예로 항-CD52 항체 (예컨대, 알렘투주맵), 항-CD-22 항체 (예컨대, 에프라투주맵), 그리고 항-CD33 항체 (예컨대 겐투주맵 오조가미신(Gemtuzumab ozogamicin))을 포함한다. 항-VEGF 항체가 암 치료를 위해 환경 영향인자와 배합되어 사용될 수도 있다. 일 실시양태에서 항-VEGF 항체는 베바시주맵(bevacizumab)이다. 다른 실시양태에서, 생물학적 약제는 항-EGFR 항체인 항체이며, 예컨대, 세툽시맵이다. 또 다른 예는 항-당단백 17-1A 항체 에드레콜로맵(edrecolomab)이다.
- [0240] 또 다른 실시양태에서, 생물제제는 사이토카인이다. 사이토카인 치료는 단백질(사이토카인)을 사용하는 것으로, 개체의 면역 시스템 인식을 돕고, 암화된 세포를 파괴한다. 사이토카인은 면역 시스템에 의해 신체내에서 자연적으로 생성되나, 실험실에서 생산될 수도 있다. 이러한 치료법은 진행된 흑색종에 대해 사용되며, 어쥬번트 치료법(1차 암 치료 후 또는 그에 더하여 주어지는 치료)과 함께 사용된다. 사이토카인 치료는 신체의 모든 부분에 다다르며, 암 세포를 죽이고 암세포의 성장을 막는다.
- [0241] 또 다른 실시양태에서, 생물제제는 퓨전 단백질이다. 예를 들면, 재조합 인간 Apo2L/TRAIL (Genentech)이 배합 치료에 사용될 수 있다. Apo2/TRAIL은 세포사멸(아포토시스, 프로그램된 세포사멸)의 조절에 관여하는 프로-아포토틱 수용체 DR4 및 DR5를 모두 활성화시키도록 디자인된 최초의 이중 프로-아포토틱 수용체 작용제이다.
- [0242] 일 실시양태에서, 생물제제는 안티센스 핵산 분자이다.
- [0243] 여기 사용된 바와 같이, "안티센스" 핵산은 단백질을 코딩하는 "센스" 핵산에 대해 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 예를 들면 이중-가닥 cDNA 분자의 코딩 가닥에 대해 상보적인, mRNA 서열에 대해 상보적이거나 유전자의 코딩 가닥에 대해 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 안티센스 핵산은 센스 핵산과 수소결합할 수 있다.
- [0244] 일 실시양태에서, 생물학적 약제는 siRNA 분자이고, 예를 들면 신생혈관생성을 증진시키는 분자의 siRNA 분자이며, 예컨대 bFGF, VEGF 및 EGFR이다. 일 실시양태에서, 신생혈관생성을 저해하는 생물학적 제제는 RNAi를 매개한다. RNA 간섭(RNAi)은 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 사용한 전사 후, 표적화된 유전자-침묵 기술이며, dsRNA와 동일한 서열을 함유하는 메신저 RNA(mRNA)를 분해한다(Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999); Cottrell TR, and Doering TL. 2003. Trends Microbiol. 11:37-43; Bushman F.2003. MoI Therapy. 7:9-10; McManus MT and Sharp PA. 2002. Nat Rev Genet. 3:737-47). 상기 과정은 내생 리보뉴클레아제가 더 긴 dsRNA를 짧게 분할하여, 작은 간섭 RNA 또는 siRNA라 불리는 21- 또는 22-뉴클레오티드-길이 RNA로 분할할 때 일어난다. 더 작은 RNA 단편은 그 후 표적 mRNA를 매개한다. RNAi의 합성을 위한 키트는 예컨대 뉴 잉글랜드 바이오랩 및 앰비온으로부터 상업적으로 입수가능하다. 일 실시양태에서, 안티센스 RNA에 사용되기 위한 상기 기재된 하나 또는 그 이상의 화학식이 RNAi를 매개하는 분자에 사용될 수 있다.
- [0245] 세포에서 특정 단백질의 발현을 하향조절하기 위한 안티센스 핵산의 사용은 이 기술분야에 잘 알려져 있다.(예를 들면 Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986; Askari, F.K. and McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334:316- 318; Bennett, M.R. and Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92:1981-1993; Mercola, D. and Cohen, J.S. (1995) Cancer Gene Ther. 2:47-59; Rossi, JJ. (1995) Br. Med. Bull. 51:217-225; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335 참조). 안티센스 핵산 분자는 다른 핵산 분자의 코딩 가닥(예를 들면, mRNA 서열)에 대해 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 따라서 다른 핵산 분자의 코딩 가닥과 수소결합할 수 있다. mRNA의 서열에 대해 상보적인 안티센스 서열은 mRNA의 코딩 영역에서 발견되는 서열, mRNA의 5' 또는 3' 비번역 영역 또는 코딩 영

역과 비번역 영역이 연결된 영역(예를 들면 5' 비번역 영역 및 코딩 영역의 접합(junction)에 있는)에 대해 상보적일 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 mRNA를 코딩하는 유전자의 조절영역(regulatory region)에 대한 서열, 예컨대 전사 개시 서열 또는 조절 인자에 상보적일 수 있다. 바람직하게, 안티센스 핵산은 mRNA의 코딩 가닥 또는 3' 비번역 영역상 개시 코돈을 앞서거나(preceding) 스패닝(spanning)하는 영역에 대해 상보적일 수 있도록 디자인된다.

[0246] 신생혈관생성을 증진시키는 분자의 코딩 가닥 서열을 감안하여, 왓슨 및 크릭 염기 쌍형성 법칙에 따라 본 발명의 안티센스 핵산이 디자인될 수 있다. 안티센스 핵산 분자는 mRNA의 전체 코딩 영역에 대해 상보적일 수 있으나, 더욱 바람직하게는 mRNA의 코딩 또는 비코딩 영역의 일 부분에 대한 안티센스인 올리고뉴클레오티드이다. 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 mRNA의 번역 시작 부위를 둘러싼 영역에 대해 상보적일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0247] 본 발명의 안티센스 핵산은 화학적 합성 및 효소적 결합 반응을 사용하여 이 기술분야에 알려진 과정에 따라 만들어질 수 있다. 예를 들면, 안티센스 핵산(예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드)은 자연 발생적 뉴클레오티드 또는 분자의 생물학적 안정성을 증가시키도록 또는 안티센스 및 센스 핵산, 예컨대 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘 치환된 뉴클레오티드 사이에 형성되는 이중가닥의 물리적 안정성을 증가시키기 위하여 디자인된 다양하게 변형된 뉴클레오티드가 사용될 수 있다. 안티센스 핵산을 만드는데 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오티드의 예로는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸사이토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실케오진, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5'-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오진, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 비부톡소신(wybutoxosine), 수도우라실, 케오진, 2-티오사이토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실, (acp3)w, 그리고 2,6-디아미노퓨린을 포함한다. 세포에서 발현을 저해하기 위하여 하나 또는 그 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있다. 선택적으로, 안티센스 기원이 서브클로닝되어 있는 발현 벡터를 사용함으로써 안티센스 핵산을 생물학적으로 생산될 수 있다(즉, 삽입된 핵산으로부터 전사된 RNA는 안티센스 기원일 수 있고, 관심 핵산을 표적화하며, 하기 세부항목에 더욱 기재되어있다).

[0248] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 핵산 분자는 아노머 핵산 분자이다. 아노머 핵산 분자는 상보적인 RNA와 함께 특정 이중-가닥 하이브리드를 형성하며, 상보적인 RNA는 보통의 a-단위, 서로 평행한 가닥(strands run parallel to each other)에 대해 반대이다(Gaultier et al. (1987) Nucleic acids. Res. 15:6625-6641). 안티센스 핵산 분자는 또한 2'-O-메틸리보뉴클레오티드(Inoue et al. (1987) Nucleic acids Res. 15:6131-6148) 또는 키메라 RNA-DNA 아날로그(Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330)를 포함할 수 있다.

[0249] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 핵산은 RNAi를 매개하는 화합물이다. RNA 간섭 약제는 이로 제한되는 것은 아니나, 표적 유전자 또는 유전자 서열에 상응하는 RNA 분자를 포함하는 핵산 분자, "짧은 간섭 RNA"(siRNA), "짧은 헤어핀" 또는 "짧은 헤어핀 RNA"(shRNA), 그리고 소분자를 포함하며, 이들은 RNA 간섭(RNAi)에 의해 표적 유전자의 발현을 방해하거나 저해한다. RNA 간섭은 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 사용한 전사 후, 표적화된 유전자-침묵 기술이며, dsRNA와 동일한 서열을 함유하는 메신저 RNA(mRNA)를 분해한다(Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999)). 상기 과정은 내생 리보뉴클레아제가 더 긴 dsRNA를 짧게 분할하여, 작은 간섭 RNA 또는 siRNA라 불리는 21- 또는 22-뉴클레오티드-길이 RNA로 분할할 때 일어난다. 더 작은 RNA 단편은 그 후 표적 mRNA를 매개한다. RNAi의 합성을 위한 키트는 예컨대 뉴 잉글랜드 바이오랩 및 엠비온으로부터 상업적으로 입수가능하다. 일 실시양태에서, 안티센스 RNA에 사용되기 위한 상기 기재된 하나 또는 그 이상의 화학식이 적용될 수 있다.

[0250] 예컨대 신생혈관생성을 저해하는 분자를 코딩하는 핵산 분자는 개체의 세포에서 코딩되는 단백질 발현에 적합한 형태로 개체에 도입될 수 있으며, 또한 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 신생혈관생성을 저해하는 예시적 분자로는, 이로 제한되는 것은 아니나, TSP-1, TSP-2, IFN-g, IFN-a, 안지오테닌, 엔도스타틴, 투마스타틴, 칸스타틴, VEGF, PEDF, 바소히빈 및 프로락틴 2-메톡시에스트라디올의 16kDa 단편을 포함한다(Kerbel (2004)

J. Clin Invest 114:884, 리뷰용으로 참조).

- [0251] 예를 들면, 표준 분자생물학적 기술을 사용하여 전장 또는 부분 cDNA 서열을 제조할 발현 벡터내로 클로닝하고 벡터는 세포에 형질감염시킨다. cDNA가 수득될 수 있는데, 예를 들면 폴리머라아제 사슬 반응(PCR)을 사용하여 증폭시킴으로써 또는 적절한 cDNA 라이브러리를 스크리닝 함으로써 수득될 수 있다. cDNA의 뉴클레오티드 서열이 PCR 프라이머 디자인에 사용될 수 있으며, 표준 PCR 방법에 의해 cDNA를 증폭하는 것을 가능하게 하거나, 표준 하이브리드화 방법을 사용하여 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위하여 사용될 수 있는 하이브리드화 프로브를 디자인 하는 것을 가능하게 한다. cDNA의 분리 또는 증폭 다음, DNA 단편이 적절한 발현 벡터로 도입된다.
- [0252] 본 발명의 방법에 사용되기 위한 예시적 생물학적 제제로는, 이로 제한되는 것은 아니나, 제피티닙(Iressa), 아나스트라졸, 디에틸stil베스테롤, 에스트라디올, 프레마린, 탈록시펜, 프로게스테론, 노르에티노드렐, 에스티스테론, 디메스티스테론, 메제스트롤 아세테이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 노르에티스테론(norethisterone), 메틸테스토스테론, 테스토스테론, 텍사메타손, 프레드니손, 코르티졸, 솔루메드롤, 타목시펜, 풀베스트란트(fulvestrant), 토레미펜(toremifene), 아미노글루테티미드, 테스톨락톤(testolactone), 드롤록시펜(droloxifene), 아나스트로졸(anastrozole), 비칼루타미드(bicalutamide), 플루타미드(flutamide), 닐루타미드(nilutamide), 고세렐린(goserelin), 플루타미드(flutamide), 루프로리드(leuprolide), 트립토텐린(triptorelin), 아미노글루테티미드, 미토텐인(mitotane), 고세렐린(goserelin), 세톡시맵(cetuximab), 얼로티닙(erlotinib), 이마티닙(imatinib), 토시투모맵(Tositumomab), 알렘투주맵(Alentuzumab), 트라스투주맵(Trastuzumab), 겐투주맵(Gentuzumab), 리톡시맵(Rituximab), 이브리투맵 티옥세탄(Ibritumomab tiuxetan), 베바시주맵(Bevacizumab), 데닐루킨 디프티톡스(Denileukin diftitox), 다클리주맵(Daclizumab), 인터페론 알파, 인터페론 베타, 항-4-1BB, 항-4-1BBL, 항-CD40, 항-CD 154, 항-OX40, 항-OX40L, 항-CD28, 항-CD80, 항-CD86, 항-CD70, 항-CD27, 항-HVEM, 항-LIGHT, 항-GITR, 항-GITRL, 항-CTLA-4, 용해성 OX40L, 용해성 4-1BBL, 용해성 CD154, 용해성 GITRL, 용해성 LIGHT, 용해성 CD70, 용해성 CD80, 용해성 CD86, 용해성 CTLA4-Ig, GVAX® 및 이들의 조합을 포함하며, 특정 종양 또는 암의 케어에 적절한 표준에 기초할 때 이 기술분야의 기술자에게 용이하게 명백하다. 약제의 용해성 형태는 예를 들면 퓨전 단백질로 제조될 수 있고, 예를 들면 Ig-Fc 영역과 함께 약제를 작동가능하게 연결함으로써 제조될 수 있다.
- [0253] 하나 이상의 첨가제, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5개가 CoQ10과 함께 배합되어 투여될 수 있다는 점을 염두에 두어야 한다. 예를 들면 일 실시양태에서, 2개의 화학치료제가 CoQ10과 배합되어 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 화학치료제, 생물학적 제제 및 CoQ10이 투여될 수 있다.
- [0254] 다양한 형태의 생물학적 제제가 사용될 수 있다. 이들은, 제한없이, 대용형 분자로서의 그런 형태, 전하를 띄지 않는 분자, 분자 복합체, 염, 에테르, 에스테르, 아마이드 기타 등을 포함하며, 이들은 임플란트, 주사 또는 기타 종양에 삽입될 때 생물학적으로 활성화된다.
- [0255] 본 발명은 또한 제한되는 것으로서 이해되지 않는 하기 실시예에 의해 더욱 설명된다. 본원에서 인용된 모든 참조문헌 및 공개 특허 및 특허 출원의 모든 부분은 참조문헌으로서 여기에 포함된다.
- [0256] 발명의 예시
- [0257] 실시예 1: MIM으로서의 CoQ10의 구분
- [0258] CoQ10의 MIM으로서의 가능성에 대해 평가하기 위해, 암 세포주와 정상 대조 세포주를 둘 다 포함한 세포주의 집합에 산화형 CoQ10이 외부로부터 추가되었고, 각 세포주의 세포 미세환경 속성에 유도된 변화가 평가되었다. 세포 형태/생리, mRNA와 단백질 수준을 둘 다 포함한 세포 조성에 대한 변화가 분석되었고 정상 세포와 질병 세포에서 그러한 변화가 비교되었다. 이러한 실험의 결과로부터 CoQ10과 특히 MIM으로서 CoQ10의 산화형을 확인했다.
- [0259] 실험의 첫 세트에서 CoQ10에 대한 민감도와 세포의 세포사멸 반응을 측정함으로써 세포 형태/생리 변화를 분석하였다. 대조 세포주 (각질세포와 멜라닌세포의 일차배양)와 여러 피부암 세포주(SK-MEL-28, 비 전이성 피부암; SK-MEL-2, 전이성 피부암; 또는 SCC, 편평세포암; PaCa2, 췌장암 세포주; 또는 HEP-G2, 간암 세포주)를 포함한 피부 세포주군이 다양한 양의 조효소 Q10으로 처리되었다. 이러한 실험의 결과는 암세포에서만 세포사멸과 세포 죽음을 유도함과 대조 세포주와 비교 시 암 세포주의 농도 의존적 반응이 변화되었음을 입증했다. 본보기 실험은 아래 실시예 3에 상세하게 설명되어 있다.
- [0260] 다음으로 CoQ10 처리에 따른 세포 조성의 변화를 평가하기 위한 분석을 하였다. mRNA 수준에서 유전자 발현의 변화는 실시간 PCR 분석방법을 이용하여 분석되었다. 본보기 실험이 아래 예 6과 9-13에 상세하게 설명되어 있다. 보완실험에서 단백질 수준에서 유전자 발현의 변화가 항체 마이크로어레이법, 2차원 겔 정지영동 실험을 이

용하여 분석되었고, 그 후 질량 분석을 이용해 단백질을 확인한 후 웨스턴 블롯 분석되었다. 본보기 실험이 아래 실시예 4, 7, 8에 각각 상세히 설명되어 있다. 이러한 분석에서의 결과로 mRNA와 단백질 수준에서 모두 산화형 CoQ10의 추가에 의해 시험된 세포주에서 상당한 유전자 발현의 변화가 유도되었음을 증명하였다. CoQ10 처리에 의해 조절된 유전자는 세포사멸, 암 생물학, 해당작용과 대사, 분자 수송, 세포 신호전달을 포함한 여러 세포 경로 내에서 무리를 이루어 발견된다.

[0261] 세포내로의 CoQ10 침투를 확인하고 세포에 있는 CoQ10 수준과 형태를 밝히기 위해 실험이 수행되었다. 특히, 미토콘드리아에 조효소 Q10의 수준뿐만 아니라 CoQ10의 형태 (예, 산화형 또는 환원형)가 CoQ10 처리된 세포에서 미토콘드리아 농축 샘플(preparations)을 분석함으로써 밝혀졌다. 외부에서 Q10을 추가하면 미토콘드리아 내 존재하는 조효소 Q10 수준이 시간과 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였다. 놀랍고 예상치 못하게, CoQ10은 미토콘드리아에서 주로 산화형으로 존재함이 확인되었다. 추가적으로, 미토콘드리아 농축 샘플의 단백질 수준의 변화가 2D 겔 전기영동과 질량 분석법을 통한 단백질 식별을 이용해 분석되었다. 이러한 실험의 결과로 대사와 세포사멸 경로와 연관된 특정 단백질에 대한 mRNA와 단백질 수준 조절에 의해 증명된 것 시간에 따라 실시된 미토콘드리아 내 CoQ10 산화형의 수준이 세포 변화의 다양함과 연관성이 있음을 확인했다. 본보기 실험이 아래 실시예 5에 상세히 설명되어 있다.

[0262] 본 출원에 설명된 결과로 내인성 분자 CoQ10과 특히 산화형 CoQ10이 MIM으로 확인되었다. 예를 들어, CoQ10이 mRNA와 단백질 수준 모두에서 유전자 발현 변화를 유도하는 것이 관찰되었기 때문에 이러한 결과를 통해 CoQ10을 MIM으로 확인했다. 또한 CoQ10이 정상 상태(예, 비 암종)와 비교하였을 때 질병 상태(예, 암)에서 세포 형태/생리와 세포 조성(예, mRNA와 단백질 수준에서 모두 유전자 발현의 변화)에 각기 다른 변화를 유도하였기 때문에 이러한 결과를 통해 CoQ10이 다양한 특징을 가진다고 확인했다. 게다가, 이 실험결과를 통해 CoQ10이 세포를 통과할 수 있고 그에 따라 치료효과와 운반효과를 모두 보였다는 점에서 CoQ10이 다양한 특징을 가짐을 확인하였다.

[0263] 실시예 2: 질병 관련 과정과 종양학적 장애에 대한 바이오마커를 확인하는 방법

[0264] 관심있는 물질로 처리된 세포주에서 이루어진 세포기반 분석에서, 처리되고 처리되지 않은 세포의 차이가 mRNA 어레이, 단백질 항체 어레이, 2D 겔 전기영동을 통해 분석되었다. 비교샘플 분석에서 MIM 또는 epi-전환인자에 의해 조절된다고 확인된 단백질은 Systems Biology perspective with pathway analysis (Ingenuity IPA software)와 알려진 문헌의 검토를 통해 분석되었다. 치료적인 또는 바이오 마커 표적 가능성이 있다고 확인된 단백질에 대해 웨스턴 블랏 분석, siRNA 녹-다운 또는 재조합 유전자 생성 또는 특성분석 방법과 같은 확증시험을 하였다.

[0265] 실시예 3-8에 대한 물질과 방법

[0266] 조효소 Q10 모액

[0267] 500 μM 조효소 Q10 (5% 이소프로판올 세포성장 배지)가 다음과 같이 준비되었다. 500 μM 조효소 Q10 10mL 모액은 항상 새롭게 제조되었다. 분자량:863.34 (0.0005 mol/L)(0.010 L)(863.34 g/mol) = 0.004317 g

[0268] 500 μM 모액 10mL를 제조하기 위해, 조효소 Q10 4.32mg을 측정하여 15mL 팔콘튜브에 넣고 500 μL의 이소프로판올을 추가하였다. 용액은 약 50-60 ° C 수조에서 데워졌고 완전히 용해되도록 저었다. 본 용액에 9.5mL 배지(세포성장 배지와 동일)가 추가되었다.

[0269] 세포배양

[0270] 세포들은 American Type Culture Collection 또는 Gibco에서 입수하였다. 세포는 5% 소태아혈청(FBS), 0.25 μg/mL 암포테리신, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 100 U mL<sup>-1</sup> 페니실린이 보강된 DMEM/F-12 배지에서 성장시켰다. 세포들은 섭씨 37도에서 95%공기와 5% 이산화탄소가 있는 공기에서 유지되었다.

[0271] 조효소 Q10치료와 단백질 분리

[0272] 세포들은 Q10에 노출되기 전에 85% 포화상태(confluency)까지 성장되었다. 보강배지는 Q10으로 농도 50 μM, 100 μM까지 조정되었다. 플라스크는 대조군인 50 μM Q10, 100 μM Q10으로 3회 처리되었다. 단백질은 4, 8, 12, 24시간 후 처리된 플라스크와 대조 플라스크로부터 분리되었다. 단백질 분리를 위해, 세포들은 pH 7.4의 차가운 PBS 5mL로 3회 세척되었다. 그런 후 세포를 3mL PBS에서 긁어 모으고, 원심분리기로 응집시키고, pH 7.4의 용해완충액(80mM TRIS-HCl, 1% SDS, 프로테아제와 포스포타제 저해제와 함께)에서 재부유시켰다. 단백질 농도는

BCA법을 이용하여 정량화되었다.

- [0273] 세포주
- [0274] 아래 나열된 세포주들은 증식되었고 각 세포주에 대한 세포은행(cell bank)이 설립되었다. 다양한 분석을 위한 세포의 대규모 생산이 수행되었고 분석을 위해 물질이 채취되었다. 일반적으로, 세포주 유지를 위해 세포 특이적 배지가 요구되지 않을 때, 세포배양을 위해 사용된 배지는 5% 혈청이 있는 DMEMF-12였다. 세포들은 분열, 세포분석에의 이용, 다음의 표준 실습법 이전에 보통 75-80% 포화상태(confluence, clear spacing)까지 배양되었다. 다음의 세포주들이 실험을 위해 설정되었다:
- [0275] SK-MEL-28 (비-전이성 피부 흑색종)
- [0276] SK-MEL-2 (전이성 피부암)
- [0277] HEK293 (각질세포, 피부조직)
- [0278] HEMa (멜라닌 세포, 피부조직)
- [0279] nFIB (신생 섬유아세포)
- [0280] HEP-G2 (간암) [SBH 세포주]
- [0281] SkBr-3 (유방암, Her2 과발현)
- [0282] MCF-7 (유방암, p53 돌연변이)
- [0283] PC-3 (전립선암) [SBH 세포주]
- [0284] SkBr-3 (인간 유방 선암)
- [0285] NCI-ES-0808
- [0286] SCC (편평세포암)
- [0287] PaCa-2
- [0288] NIH-3T3
- [0289] 세포 배양:
- [0290] 세포들은 American Type Culture Collection 또는 Gibco에서 입수하였다. 소태아혈청(FBS), 0.25 µg/mL 암포테리신, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 100 U mL<sup>-1</sup> 페니실린이 보강된 DMEM/F-12 배지에서 성장시켰다. 세포들은 37°C에서 95%공기와 5% CO<sub>2</sub>가 있는 공기에서 유지되었다.
- [0291] 피부 악성 흑색종 SK-MEL28 세포들은 5% FBS, 암포테리신, 페니실린/스트렙토마이신이 보강된 글루타맥스가 있는 DMEM/F12에서 배양되었고 유지되었다. 세포들은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 성장하였다. 추가 세포주와 성장 조건에 대한 세부사항은 아래 표에 있다.

**표 1**

Q10 에 대한 민감성에 대해 분석된 세포주

세포주	기재	성장 조건
PaCa2	췌장 암종	Glutamax와 함께 DMEM/F12 + 10%FBS, 2.5% 말 혈청, 암포테리신, 페니실린 /스트렙토마이신.
HepG2	간세포 암종	10% FBS, 암포테리신, 페니실린 / 스트렙토마이신, 나트륨 피루베이트 및 비필수 아미노산이 보충된 열스 염과 함께 MEM
PC3	전립선 선암종	Glutamax와 함께 DMEM/F12, 5%FBS, 암포테리신 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충됨
SKBr3	유방암	Glutamax와 함께 DMEM/F12, 5%FBS, 암포테리신 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충됨
MCF-7	유방암	Glutamax와 함께 DMEM/F12, 5%FBS, 암포테리신 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충됨.

[0292]

- [0293] SKMEL28 세포의 Q10 치료:
- [0294] SK-MEL 28 세포들은 100  $\mu$ M Q10 또는 대조 매개체로 처리되었다. Q10의 제조법은 다음과 같다. 15mL 캡튜브 안에 Q10 4.32mg (Cytotech사 공급)가 옮겨지고 그 후 이소프로판올 500  $\mu$ L를 추가함으로 용해되었다. 그 결과용액은 65°C 수조에서 데워졌고 빠른 속도로 볼텍스 처리되었다. Q10/이소프로판올 용액은 평형화된 세포배양배지를 추가하여 10mL 부피로 만들어졌다. 모액은 Q10의 최고 용해도에 도달하기 위해 볼텍스 처리되었다. 모액은 최종농도 100  $\mu$ M Q10을 만들기 위해 희석되었다(모액 2mL에 배지 8mL). 대조매개체는 이소프로판올 500  $\mu$ L가 9.5mL 배지에 추가되었다. 대조모액은 8mL 배지로 추가 희석되었다(2mL 모액). 세포는 처리시작 후 6, 16, 24, 48 또는 72시간에 채취되었다.
- [0295] SCC 세포의 Q10처리:
- [0296] SCC 세포는 100  $\mu$ M Q10(상기 명시된 것처럼 준비된)으로 6시간 또는 24시간 동안 처리되었다. 대조세포는 처리되지 않은 세포였다. 세포는 처리 후 다른 시간에 수거하여 덩어리화시켰고 응집체는 RNA가 아래 설명된 것처럼 XTAL에서 분리될 때까지 급속 냉동하여 영하 80°C에서 보관되었다.
- [0297] RNA 분리:
- [0298] 세포는 RNA를 분리하기 위해 제조업체의 설명에 따라 RNeasy Mini Kit (Qiagen사, Valencia CA)키트를 이용하여 각각 다른 처리 시간에 분해되었다. RNA는 260nm에서 광학밀도를 측정하여 정량화되었다.
- [0299] 첫 번째 가닥 합성:
- [0300] 첫 번째 cDNA가닥은 제조업체의 설명에 따라 RT2 First Strnad Synthesis kit (SABiosciences., Frederick MD)을 사용하여 총 RNA 1 $\mu$ g에서 합성되었다.
- [0301] 실시간 PCR:
- [0302] 첫 번째 가닥 합성에서의 결과물은 물에서 희석되고, SYBR green master mix (SABiosciences., Frederick MD)와 섞이고 PCR 어레이 위에 로딩되었다. 실시간 PCR가 Biorad CFX96 PCR 어레이(세포사멸 어레이, 당뇨 어레이, 산화 스트레스와 항산화 방어 어레이와 열충격 단백질 어레이) 위에서 수행되었다(SABiosciences, Frederick MD).
- [0303] 아포토시스에 대한 Nexin 분석에 의해 조효소 Q10에 대한 세포주 민감도 파악:
- [0304] 초기와 후기 세포사멸 시 세포의 비율은 조효소 Q10 처리 24시간 후에 측정되었다. 초기와 후기 세포사멸은 조효소 Q10에 대한 다양한 암 세포주의 민감도의 차이를 이해하기 위한 마커로 이용되었다. 시험된 세포주들은 PaCa2, HepG2, PC-3, SKBr3, MCF-7, SK-MEL28였다. 세포는 96 웰 플레이트에 볼도록 밤새 두었다. 이러한 세포는 대조매개체, 50  $\mu$ M Q10 또는 100  $\mu$ M 조효소 Q10으로 처리되었다. 24시간 후에, 세포사멸 세포의 존재가 PCA96 유세포 분석기(Guava Technologies, Hayward, CA)에서 측정되었다. 추가로, 일부 세포들은 세포사멸을 위한 양성 대조군으로 4  $\mu$ M 스타우로스포린으로 2시간 동안 처리되었다. 세포는 처음 PBS로 세척되었고 실온에서 Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) 50  $\mu$ L로 분리되었다. 분리는 1% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)을 포함한 배양배지를 추가함으로써 중단되었다. 그런 후 각 웰에 Nexin 시약(Guava Technologies, Hayward, CA) 100  $\mu$ L를 첨가하였다. 어두운 곳에서 20분 배양 후, 세포가 기질에 재부착하는 것을 최소화하기 위하여 저결합 플레이트(low binding plate)에서 분석이 수행되었다. Nexin 시약은 두 가지 염료를 함유한다. 세포표면의 포스파티딜 세린을 감지하는 Annexin-V-PE; 초기 세포사멸 세포의 특성. 두 번째 염료, 7-AAD는 살아있고(건강한) 초기 세포사멸 세포에서는 배척되는 반면에 초기 세포사멸 세포에만 침투한다. 세포의 네 시기의 비율; 건강세포, 초기 자가사멸, 후기 자가사멸과 잔해가 Cytosoft 2.5.7 소프트웨어(Guava Technologies, Hayward, CA)를 이용하여 측정되었다.
- [0305] 면역블롯팅
- [0306] 샘플당 약 50  $\mu$ g의 단백질이 면역블롯팅을 통해 분석되었다. 모든 처리는 대조군과 함께 3회 수행되었다. 단백질은 12% TRIS-HCl 겔에서 분리되었고, 전기영동법을 통해 니트로셀유소막으로 옮겨졌고 일차 항체와 함께 배양되기 전에 5% 우유와 TBST 용액을 이용하여 저지되었다. 일차 항체는 4°C, 5% BSA와 TBST 용액에서 밤새 배양되었다. 이차 항체는 4°C에서 한 시간 동안 배양되었다. 모든 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입되었다. 1:5000 비율로 이용된  $\beta$  액틴을 제외하고, 항체는 1:1000의 비율로 이용되었다. 점이 발생되었고, 결과는 NIH

자바 기반의 광학농도계 분석 소프트웨어 이미지 J를 이용하여 정량화되었다. 모든 점은 각 β액틴 발현을 위해 탐지되었고 β액틴 발현에 대해 보정되었다.

- [0307] 2차원 전기영동
- [0308] 등전위점 초점화(IEF)전, 40mM 트리스, 7M 요소, 2M 티오요소, 1% C7 양쪽성이온 세제에 샘플이 용해되었고, 트리부틸포스핀으로 환원되었고 실온에서 90분간 10mM 아크릴아미드에 알킬화되었다. 샘플의 전도도를 환원시키기 위해 7M 요소, 2M 티오요소, 2% CHAPS으로 구성된 최소 3 볼륨의 재부유 완충액과 함께 샘플이 10-kDA 컷오프 Amicon Ultra 장치를 통해 시험된 후. 단백질 100 마이크로그램이 pH 3에서 10, pH 4에서 7 또는 6에서 11로 pH 기울기가 고정된 11cm 길이의 스트립(GE, Amersham, USA)에서 100,000 볼트 시간까지 IEF 되었다. IEF 후, pH 기울기가 고정된 스트립은 6 M 요소, 2% SDS, 50 mM 트리스-아세테이트 완충액, pH 7.0, 0.01% 브롬페놀 블루에서 평형화되었고 8-16% 트리스-염산 Precast 겔, 1mm (Invitrogen, USA)에서 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동되었다. 겔은 두 번 시험되었다. 겔은 고정되고 SYPRO Ruby, 80ml/겔, 1mm (Invitrogen, USA)로 염색되었고 후지 FLA-5100 레이저 스캐너에서 이미지화되거나 PVDF 막으로 이동되었다.
- [0309] dPC(Protein Forest Inc.) 선택적 pI 분류를 이용하는 방법을 통해 단백질 감별의 유용성을 시험하기 위해 대조 샘플에 대한 추가 정보를 얻었고, 트립신 가수분해. 단백질의 큰 하부단위를 확인하는데 유용성을 입증한 대조 샘플과 함께 dPC 분석이 수행되었다. 본 시험 동안 생산된 물질들은 향후 필요할 경우 사용할 수 있도록 보관되었다.
- [0310] 2D 겔 이미지 분석:
- [0311] 모든 겔 이미지 분석이 Progenesis Discovery와 Pro (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne, UK)를 이용하여 수행되었다. 반점 발견, 정합, 배경 제거, 보정, 여과 후 SYPRO Ruby 겔 이미지에 대한 자료가 도출되었다. 발현이 유의하게 바뀐(p>0.05) 반점을 확인하기 위해 스튜던트 t 시험(Student's t test)( Progenesis Discovery)을 이용하여 그룹간 쌍별 비교가 수행되었다.
- [0312] 항체 어레이:
- [0313] Q10 처리 세포(SK-MEL-28, SCC)에서의 단백질 농도 수치의 변화를 가능하기 위해 700개 이상의 단백질 항체를 스크린 하는데 항체 마이크로어레이(Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)가 사용되었다. 슬라이드 위의 상응하는 항체 반점에 의해 단백질이 결합될 때 세포 추출물에서의 단백질 발현이 감지되었다. 결합 전에 단백질은 형광 시각화와 정량분석에 이용되는 형광염료로 직접 표지되었다. 서로 다른 CyDye(Cy3 또는 Cy5)로 각각 표지된 두 샘플(시험샘플과 대조샘플)의 단백질 발현 프로파일을 비교하는데 어레이가 이용되었고 두 샘플은 자동적으로 어레이의 동일한 단백질 농도에 자동적으로 적용되었다. 각 샘플에 대한 형광 신호 강도는 샘플과 대조군의 염료 표지에 해당하는 파장에서 각각 기록되었다.
- [0314] 고용량의 조효소 Q10은 배양된 SKMEL-28 세포의 세포사멸, 당뇨, 산화 스트레스 경로에 연관된 유전자 발현을 조절한다.
- [0315] 실험 세부내용: SKMEL-28 세포 (ATCC Catalog # HTB-72)는 전이성이 없고, 5% FBS, 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신이 보강된 Glutamax (Invitrogen Cat# 10565-042)를 포함하는 DMEM-F12에서 배양된 피부 흑색종 세포는 각기 다른 시간동안 매개체 또는 100 μM 조효소 Q10으로 처리되었다. 조효소 Q10 처리의 결과인 유전자 발현에서 어떠한 변화는 실시간 PCR 분석(Apoptosis Cat #PAHS-12, Diabetes Cat #PAHS-023 and Oxidative Stress Cat #PAHS-065)을 이용하여 정량화되었다. (SABiosciences, Frederick, MD).
- [0316] 조효소 Q10 500 μM 모액이 4.32mg을 배지를 이소프로판올 500ul에 용해하여 준비한 후 배지를 추가하여 10ml로 희석되었다. 조효소 Q10을 번갈아가며 보텍스하고 65°C로 가열하여서 녹였다. 모액 2ml는 세포처리에 이용된 배지를 포함한 100 μM Q10을 얻기 위하여 배지로 10ml로 희석되었다. 동시에 조효소 Q10이 추가되지 않았다는 것을 제외하고는 유사한 프로토콜로 매개체가 준비되었다.
- [0317] SKMEL-28 세포는 6-웰 플레이트가 1x10<sup>5</sup> 세포/well의 밀도로 심어졌다. 24시간 뒤, 세포가 부착되고 50% 포화상태에 도달했을 때, 매개체 또는 100 μM Q10이 첨가되었다. 매개체 처리 세포는 24시간 뒤 채취된 반면, 세포는 Q10 처리 6, 12, 24, 48 또는 72시간에 채취되었다. 세포는 각기 다른 처리 시간에 스핀 컬럼과 온 컬럼 DNase 처리를 이용하여 제조업체의 설명에 따라 RNeasy Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia CA Cat #74104)을 이용하여 RNA 분리를 위해 녹여졌다. RNA는 260nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량화되었다.



- [0318] 총 RNA 0.4-1 μg을 이용한 첫 번째 가닥 cDNA 합성에 의해 실시간 PCR이 선행되었다. 첫 번째 가닥 합성의 결과물은 물로 희석되었고 SYBR green master mix(SABiosciences., Frederick MD Cat#PA-010-12)와 섞이고 일반 경로, 보정에 이용되는 5개의 하우스키핑 유전자, 역전사, PCR 컨트롤과 관련된 각기 다른 84개 유전자에 대한 프라이머 분석을 포함하는 PCR 어레이에 로딩되었다. 실시간 PCR은 Biorad Cfx96위에서 진행되었다. 증폭반응은 효소를 활성화시키기 위해 높은 온도에서 시작됐고, 그 후 (95°C 15초 이차 변성단계와 60°C 1분 결합 및 연장 단계를 각각 40번을 했고, 용해곡선 프로그램이 그 뒤를 이었다. 모든 처리군에 대한 PCR 증폭기의 결과인 Ct 값은 엑셀 스프레드시트에 정리되었고, [http:// www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php](http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php)에 있는 비교분석 소프트웨어에 로딩되었다.
- [0319] 미토콘드리아 농축 샘플의 정제:
- [0320] 실험 상세내용: t=0에서 모은 세포와 함께 24시간 또는 48시간 동안 100 μM Q10 처리된 SKMEL-28, NCI-ES0808, NIH-3T3 세포는 세척하고 T160 플라스크에서 긁어내어 수거되었다. 세포는 원심분리, 응집, 냉각처리 후 미토콘드리아가 분리될 때까지 영하 80°C에서 보관되었다. 세포 응집체는 해동되고, 재부유시킨 후 Dounce homogenizer에서 파열시켰다. 균질 현탁액은 원심분리되고 미토콘드리아는 시액과 배양세포를 위한 Mitochondria Isolation kit(MitoSciences, Eugene OR, Cat # MS852)에 권고된 프로토콜을 이용하여 분리되었다. 미토콘드리아 분획은 분취되어 영하 80°C에 보관되었다.
- [0321] 조효소 Q10과 유비퀴놀-10 정량법:
- [0322] 조효소 Q10(Q10)과 환원형인 유비퀴놀-10(Q10H2)의 동시 분석법은 최근 게재된, 양이온 모드에서 LC-MS(액체크로마토그래프 질량분석법)/전자분무 이온화 질량분석법을 통한 방법(Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chromatogr. A, 1175, 242-248)에 기초하여 시행되었다. 위 방법은 기타 선택된 지방의 감별과 동시에 Q10과 Q10H2 모두를 매우 선택적으로 확인하고 민감하게 정량화 시킬 수 있다. 100 μM Q10 처리된 SK-MEL-28의 미토콘드리아 농축 샘플 부분표본은 단백질 침전(1-프로파놀 300 μl 에서 초음파처리된 압축세포 100 μl), 액체-액체 추출(상청액에 물 100 μl 첨가하고 n-헥산 200 μl로 X3추출), 95:5 혼합 헥산 추출물의 건조상태까지 증발과 메탄올/헥산(부피/부피) 50 μl에서 복원에 기반한 일반적인 전처리되었다. 프리즘 RP 1 x 100 mm, 5 μm 입자크기 칼럼 (Keystone Scientific)이 있는 Waters Quattro II 삼단계 사중극자형 질량분석기에서 LC-MS/MS 분석이 이루어졌다. 유속 50 μl/min 에서 20% 이소프로필 알코올 80% 메탄올에 있는 4mM 포름산 암모늄으로 등용매를 분리하였다. 샘플 10 μl가 주입되었다. MRM 분석이 콘전압 40과 충돌에너지 30에서의 m/z 882.7>197.00 (Q10H2)과 m/z 880.80>197.00 (Q10) 전이를 이용하여 수행되었다.
- [0323] 실시예 3. CoQ10에 대한 세포주의 민감도
- [0324] 여러 세포주들이 Q10 적용 24시간 후 7AAD와 Annexin-V-PE 두 염료를 함유하는 시약 (Nexin 시약)을 이용하여 Q10에 대한 민감도가 테스트되었다. 7AAD 염료는 투과하기 쉬운 세포막이 있는, 주로 후기 세포사멸 시기에 있는, 세포에 들어간다. Annexin-V-PE는 초기 세포사멸 세포의 원형질막 겔표면에 노출된 포스파티딜 세린에 결합하는 염료이다. 그러므로 Nexin 시약은 유세포 분석기(flow cytometer)에서 세포사멸 세포들의 각기 다른 시기를 구분하는 데 사용 가능하다.
- [0325] PaCa2 세포는 50 μM Q10와 100 μM Q10 적용 24시간 후 초기와 말기 자기사멸 세포(개폐(gating) 세포의 5-10% 사이) 모두에서 증가됨을 보였다. PC-3세포 또한 PaCa2 세포에 비해 증가 폭은 작았지만 50 μM와 100 μM Q10에서 증가하였다. MCF-7과 SK-MEL28 세포들은 50 μM와 100 μM Q10에서 초기 자기사멸 단계에서만 증가함을 보였다. HepG2 세포 역시 50 μM Q10 처리에 민감했다. SKBr3은 50 μM 또는 100 μM Q10 처리에도 초기와 말기 자기사멸 세포에서 어떠한 유의한 증가를 보이지 않은 시험된 유일한 세포주였다. 결과들은 도면 1-6에 묘사되어있다.
- [0326] Q10 처리가 HepG2 간암 세포에서 세포사멸 반응을 유발한다는 것을 추가 확인하기 위해서, 단일가닥 DNA를 측정하는 ApoStrnad™ ELISA 방법을 이용하여 두 번째 세포사멸 분석이 이루어졌다. ApoStrnad™ ELISA는 포름아미드 변성에 대한 세포사멸 세포 DNA의 민감도와 단일가닥 DNA(ssDNA)에 대한 단일클론 항체로 변성 DNA 감지를 기반으로 한다. 50과 100 μM Q10으로 간암 세포주 HepG2 처리는 각각 17%, 32% 용량반응을 보였고(도면 7) 탐지 가능한 세포사멸을 유발했다. 이러한 결과는 다른 조직(예, SCC, SKMEL-28, MCF-7, PC-3)에서의 기타암 세포주에서 Q10이 유발한 세포사멸의 관찰과 일관된다.
- [0327] 실시예 4: Q10 처리된 세포의 단백질체 분석

- [0328] Q10 처리된 샘플의 세포 응집체는 단백질체학 방법을 이용하여 분석되었다. 세포 응집체는 2-D 겔과 웨스턴 블롯 분석법으로 분해되고 처리되었다. 세 종류의 세포(SK-MEL-28, SCC, nFib)는 Q10으로 처리되었고 2D 겔 전기영동법으로 단백질체 특징분석되었다.
- [0329] Q10 처리된 SKMEL-28세포의 단백질체 분석
- [0330] 웨스턴 블롯과 2D 겔 전기영동에 의해 진행되고 평가된 첫 실험 세트는 피부암 세포주 SKMEL-28이었다. 실험 세트는 0, 50 또는 100  $\mu$ M Q10으로 3, 6, 12, 24시간에 처리된 SK-MEL-28 세포를 포함했다.
- [0331] Q10 처리된 SK-MEL-28 샘플 세트는 2D 겔 전기영동(도 8)되었고 대조 샘플 대비 단백질 수치에 차이가 있는지 확인되었다. 대조 샘플을 모든 처리된 샘플과 비교하여 총 24개 겔에 있는 943개 점을 비교분석 하였다. 분석에서 시간에 따른 증가, 감소 또는 번역 후 변이에 의한 점 변화를 확인하였다.
- [0332] 분석을 통해 통계적으로 유의한 점(spot)의 변화 32개를 확인했다. 이것을 통해, 20개의 비 중복 지점은 트립신 가수분해(digestion)와 질량분석 특성을 통한 단백질 분석을 위해 절개하고 추출하였다. 특징 있는 펩타이드는 단백질을 확인하기 위해 Mascot과 MS-RAT 소프트웨어 분석이 있는 단백질 데이터베이스에서 찾아졌다(표 2).

**표 2**

SKMEL-28 세포에서 Q10 치료에 대해 상이한 반응을 갖는 것으로 동정된 단백질

시간 (hr)	Q10 농도 ( $\mu$ M)	2D 스팟 #	발현	차이	단백질	명칭	유형
3	50	528	하향	1.234	카텝신 D	CTSD	웹티다제
3	50	702	하향	1.575	TCP1, 서브유닛 3을 함유하는 샤페론	CCT3	기타
3	50	74	하향	1.383	진핵 해독 개시 인자 3	EIF3G	해독 조절인자
3	50	829	하향	1.074	리보솜 단백질 P2	RPLP2	기타
3	50	368	하향	1.121	트랜스알돌라제 1	TALDO1	효소
6	50	452	상향	-1.464	진핵 해독 개시 인자 6	EIF6	해독 조절인자
6	50	175	상향	-1.32	스토마틴; HSPC322	STOM	기타
6	50	827	상향	-1.457	티로신 3/트립토판 5-모노옥시 게나제 활성화 단백질	YWHAZ	효소
6	50	139	상향	-1.628	비멘틴	VIM	기타
6	50	218	상향	-1.416	비멘틴	VIM	기타
6	50	218	상향	-1.212	비멘틴	VIM	기타
6	50	139	상향	-1.036	비멘틴	VIM	기타
6	50	507	하향	1.379	라민 B1	LMNB1	기타
6	50	571	하향	1.832	미토콘드리아 수입 수용체 Tom22	TOMM22	수송체
12	50	166	상향	-1.171	ALG-2 상호작용 단백질 1	PDCD61P	기타
12	50	550	상향	-1.747	웹티닐포플린 이소머라제 A	PPIA	효소
12	50	613	하향	1.802	갈렉틴 -1	LGALS1	기타
12	50	242	하향	1.373	포스포글리세레이트 뮤타제; 포스포만노뮤타제 2	PGAM2	포스포타제
24	50	326	하향	1.385	글리실-tRNA 신타제	GARS	효소
24	50	419	하향	1.451	Mago-nashi 동족체	MAGOH	기타
3	100	528	하향	-1.036	카텝신 D	CTSD	웹티다제
3	100	702	하향	1.151	TCP1, 서브유닛 3을 함유하는 샤페론	CCT3	기타
3	100	74	하향	1.122	진핵 해독 개시 인자 3	EIF3G	해독 조절인자
3	100	829	하향	1.145	리보솜 단백질 P2	RPLP2	기타
3	100	368	하향	1.209	트랜스알돌라제 1	TALDO1	효소
6	100	139	상향	-1.829	비멘틴	VIM	기타
6	100	218	상향	-1.761	비멘틴	VIM	기타
6	100	452	하향	1.134	진핵 해독 개시 인자 6	EIF6	해독 조절인자
6	100	252	하향	1.4	Sec 13 단백질, 케라틴 II		
6	100	827	하향	1.12	티로신 3/트립토판 5-모노옥시 게나제 활성화 단백질	YWHAZ	효소
12	100	76	상향	-1.679	갈렉틴 -1; 케라틴 II	LGALS1	기타

- [0333]
- [0334] 본 실험에서의 중요한 발견은 트랜스알돌라제 1의 감소이고 이러한 사실은 Q10이 암세포에서 대사상태를 변화

시킨다는 전제를 뒷받침한다. 트랜스알돌라아제 1은 5탄당 인산경로(육탄당 일인산 회로라고도 알려진)에 있는 효소이다. 트랜스알돌라아제(EC:2.2.1.2) 세도헥톨로오즈 7-인산에서 글리세르알데하이드-3-인산으로 에리트로오즈-4-인산과 프룩토오즈 6-인산을 만들기 위한 탄소 세 개 케톨단위의 가역적 운반을 촉매한다. 트랜스케톨라아제와 함께 이 효소는 해당경로와 5탄당 인산경로를 연결한다. 이것은 생합성반응과 환원환경 유지를 위해 환원 당량 생성을 촉진하기 위한 뉴클레오티드와 NADPH 합성과 관련 있다.

- [0335] 최근 논문(Basta, P., et.al. August 2008, Cancer Detect Prevention, 32, 200-208)은 트랜스알돌라아제의 유전적 다형성의 증거를 제시했고 두경부의 편평세포암과 연관 있다. 또 다른 최근의 논문(Qian, Y., et.al. May 2008, Biochem J, 415, 123-134)에서는 미토콘드리아 항상성, 칼슘 유동, 세포사멸의 조절인자로서 트랜스알돌라아제 결핍을 확인했다.
- [0336] 이러한 초기 결과로부터, 2D 겔 전기영동으로 Q10에 의해 조절된다고 확인된 기타 단백질이 알려진 관계(도면 9)에 대해 분석되었다. 이러한 단백질의 기능분석으로 다양한 과정[세포주기; 5탄당 인산 경로(TALD01); 세라마이드 신호법(CTSD); 아미노아실-tRNA 생합성(GARS), 미토콘드리아 단백질 수송(TOM22)]에 연관된 개개의 단백질과 함께 14-3-3-매개 신호(PDCP6IP, YWHAZ, VIM)에 연관된 그룹이 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0337] Q10 처리된 SCC 세포의 단백질체 분석
- [0338] 이전 SK-MEL-28분석의 후속 실험으로 또 다른 피부암 세포주, 편평세포암(SCC)이 준비되었고 2D 전기영동법으로 분석되었다. SCC 세포는 채취 전 6시간 또는 24시간 동안 100  $\mu$ M Q10으로 처리되었다. 처리되지 않은 세포도 대조군으로 채취되었다. 세포 응집체는 녹여졌고 샘플은 2D 전기영동(2회)되었다. 6시간과 24시간 처리에 대한 대조 샘플과 비교하여 600개 이상의 단백질 반점 분석이 비교실험에서 수행되었다.
- [0339] 상위 24개의 유의한 반점 변화가 2D 전기영동 겔의 비교분석에서 평가되었다. 이를 통해, 12개 반점은 삭제되었고 트립신 가수분해와 질량분석 특성(아래 표3에 결과요약)을 통해 확인되었다.

표 3

6시간 및 24시간에 SCC 세포에서 100 μM Q10 치료에 대한 상이한 반응을 갖는 것으로 동정된 단백질

스팟 #	단백질	명칭	세포 위치	기능	반응 (배수 변화)
331	트랜스알돌라제 1	TALD01	세포질	효소	6시간 및 14시간에 감소(1.5)
23	사람 BSCv (염색체 20 판독 프레임 3)	C20ORF3	세포질 막	스트릭토시딘 신타제	6시간 및 24시간에 감소(2.1)
54	NM23 단백질	NME1	핵 (미토콘드리아)	키나제	6시간에 증가, 24시간에 감소
116	MCF7 유방암 세포주(HSP 70) 기원의 2개의 사람 EST			HSP70	6시간에 감소(2.6), 추가로 24시간에 감소
176	열 쇼크 27kDa 단백질 1	HSPB1	세포질	환경 스트레스에 대한 반응	6시간 및 24시간에 증가(-1.9)
135	케라틴 I	KRT1	세포질	중간 필라멘트	6시간 및 24시간에 감소(2.3)
50	케라틴 14	KRT14	세포질	중간 필라멘트	6시간 및 24시간에 증가(-1.6)
68	케라틴 13	KRT13	세포질	중간 필라멘트	6시간 및 24시간에 증가(-1.5)
49	트로테아솜 베타 7	PSMB7	세포질	프로테아솜 서브유닛	24시간에서만 감소(1.6)
93	프로테아솜 활성화 인자 서브유닛 3	PSME3	세포질	펩티다제	24시간에서만 감소(1.3)
66	Rho GDP 해리 억제제 (GDI) 알파	ARHGDI A	세포질	억제제	6시간에서만 감소(1.5)
1	공지되지 않음				감소(9.5)

[0340]

[0341]

트랜스알돌라아제 1: Q10 처리된 SKMEL-28 세포에서 이전에 관찰된 바와 같이, 트랜스알돌라아제 1 효소는 수치가 감소되었다. 이것을 통해 Q10과 트랜스알돌라아제(및 그에 따른 세포의 대사상태)의 변화간 사전에 관찰된 연관성 독자적으로 확인된다.

[0342]

트랜스알돌라아제는 5탄당 인산 경로(도면 10)의 비산화 상태에 있는 효소이다. 5탄당 인산 경로는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(환원된 NADH) 생성, 환원적 생합성, ATP, DNA, RNA의 필수 요소인 리보오즈 형성을 위한 세포의 대사 상태에 필수적이다. 또한 트랜스알돌라아제는 해당과정과 5탄당 인산경로를 연결한다. 해당과정은 산화적 인산화의 미토콘드리아 과정이 이용되지 않음에 따라 암세포가 세포 생존에 필요한 에너지를 얻는 대사경로이다. Q10은 산화적 인산화와 미토콘드리아 ATP 생성에 요구되는 필수 조효소 요소이다.

[0343]

BSCv: 반점 23은 BSCv라 명명된 크로모솜 20 기원의 새로운 인간 단백질이었다. BSCv 단백질은 아디포사이트 원형질막 결합 단백질(유전자명: APMAP 또는 C20orf3)로도 알려져 있고 단백질의 스트릭토시딘 합성효소(strictosidine synthase)계와 유사한 서열의 단일 막통과 타입 2 막단백질로 예상된다. Q10 처리는 이 단백질 수치의 감소를 야기했다. 이 단백질은 잘 특성화되지 않았고, 스트릭토시딘 합성효소와 상동관계도 확인되지 않았다. 재미있게도, 이 단백질은 아디포사이트 분화(Albrektsen et al., 2001)와 관련 있다. 인간 대망 지방조직에 대한 최근의 단백질체 연구는 BSCv가 병리학적으로 비만인 여성의 다낭성 난소 증후군(PCOS)에 대해 각각 다르게 발현하는 9개의 단백질 중 하나임을 확인하였다(Corton, 2008 Hum. Reprod. 23: 651-661). Q10에 반응하는 세포 표면 단백질과 같이 BSCv에 대한 항체는 바이오마커로 활용될 수 있다. 통용되는 결과와 가능한 문헌을

근거로, BSCv는 암과 당뇨에서 잠재적인 역할을 할 수 있다.

- [0344] NM23A: 비전이성 세포 1, 단백질 (NME1로도 알려진 NM233A)은 전이 억제제로 예상된다. 이 유전자(NME1)는 상당히 전이적인 세포에서 감소된 mRNA 전사수준을 보였기 때문에 발견되었다. 이 단백질은 이인산 뉴클레오사이드 카이네이즈(NDK)로도 활성이 있고 'A'(이 유전자에 의해 암호화된)와 'B'(NME에 의해 암호화된) 아형으로 구성된 6합체로 존재한다. 이 유전자의 돌연변이는 공격적인 신경세포 종양에서 확인되었다. NDK 활동은 예를 들어 구연산(크랩스) 회로에서 GTP가 ATP로 변하는 때와 같이 서로 다른 삼인산 뉴클레오사이드 간의 평형을 유지한다. NDK 복합체는 STRAP과의 상호작용을 통해 p53과 관련이 있다. STRAP가 HNF4A와 연관 있다는 것은 주목할만하다. 그러므로, NM23A는 세포 조절과 질병 치료에 중요한 회로에 포함될 가능성이 있는 단백질이다.
- [0345] Rho GDP 해리 억제자(GDI) 알파: GDI는 Rho 단백질로부터 GDP 해리와 그에 따른 Rho 단백질로의 GTP 결합을 저해함으로써 Rho 단백질의 GDP/GTP 교환반응을 조절한다. 이 단백질은 암세포에서 상향조절되어 있다.
- [0346] 실시예 5: 미토콘드리아 농축 분석
- [0347] 여러 근거가 미토콘드리아 단백질과 암 생물학과 Q10 반응의 역할에 대한 정밀한 평가가 이루어졌다고 시사한다. 첫째로, 정상세포에서 에너지 생산을 위한 미토콘드리아 산화적 인산화 과정에서 Q10의 역할이 필수적이다. 그러나, 암세포에서 일어나는 대사의 변화는 Q10을 요구하지 않는 해당과정의 대체 경로를 통해 에너지를 생산한다. 둘째로 세포의 세포사멸 반응이 일어나기 위해서는 미토콘드리아 단백질 요구된다. Q10은 암세포 (Bcl-2-단백질 그룹, 사이토크롬 c)에서 세포사멸을 촉진한다고 밝혀졌다. 마지막으로, 미토콘드리아 수송 수용체 단백질 TOM22(이하 설명된 실험 참고)이 단백질 수치를 통해 조절되는 것처럼 새로운 미토콘드리아 단백질이 Q10치리에 의해 조절됨이 확인되었다.
- [0348] 미토콘드리아 농축 샘플 생산:
- [0349] 피부암 SKMEL-28 세포가 100  $\mu$ M Q10 또는 가짜 매개체로 6, 19 또는 48시간 동안 처리되었다. 세포는 세척하고 T-160 플라스크 (각 시간에 4)에서 굽어서 채취하였다. 세포는 원심분리를 통해 모아졌고 응집체는 냉각 후 영하 80°C에 보관하였다. 세포 응집체는 재부유되고 2mL Dounce 균질화기를 이용해 파열되었다. 시약과 방법은 배양 세포용 미토콘드리아 분리 키트(MitoSciences, Cat# MS852)에서 구했다. 그 결과로 생긴 미토콘드리아 샘플은 75  $\mu$ L 분취액(한 샘플당 4-5 분취액)으로 나눠지고 영하 80도에 보관되었다.
- [0350] Q10 처리된 SK-MEL-28 세포로부터 분리된 미토콘드리아 농축 샘플의 단백질체 분석
- [0351] 6, 19, 48 시간 동안 100  $\mu$ M Q10 처리된 SK-MEL-28 미토콘드리아 농축 샘플(상응하는 가짜 매개체 대조군과 함께)의 두 분취액에 용해되어있는 단백질에서 2D 겔 전기영동이 수행되었다. 샘플은 두 번 2D 전기영동되었다. 대조군 샘플을 다른 시간대 샘플과 비교하는 비교시험에서 525 단백질 반점분석이 수행되었다(도면 11).
- [0352] 2D 전기영동 겔 비교분석에서 9개의 통계적으로 유의한 반점 변화가 선택되었다. 이를 통해 9개 반점을 트립신 가수분해와 질량분석 특성화에 의한 확인을 위해 제출되었다.

표 4

SKMEL-28 미토콘드리아에서 Q10 치료에 대한 상이한 반응을 갖는 것으로 동정된 단

백질

스팟 #	단백질	명칭	기능	반응 (배수 변화)
11	미지의 단백질			6시간에 상향 (1.3), 이후 낮은 수준으로 하강
131	스팟 #11과 동일한 미지의 변형된 것			6시간에서 하향 (1.3), 19시간 및 48시간동안 더 하강
279	아실-CoA 티오에스테라제 7 이소형 hBACHb	ACOT7	지방 아실 CoA를 지방산 및 CoA로 절단	6시간에서 하향 (1.3), 48시간에 정상 복귀
372	피루베이트 키나제	PKM2	피루베이트 및 ATP로부터 포스포에놀피루베이트의 생성 촉매	6시간에 하향 (1.5), 48시간에 정상 복귀
110	ER60 단백질	PDIA3	단백질 디설파이드 이소머라제	19 및 48시간에서 상향
185	케라틴 10	KRT10	중간 필라멘트	19시간에서만 상향
202	베타-액틴		구조적 단백질	19시간에서만 상향
246	말렉틴	MLEC	소포체의 탄수화물 결합 단백질 및 단백질 N-당화의 초기 단계에서 후보 플레이어	19시간에서만 상향
75	58을 함유하는 코일 도메인	CCDC58	보존성 가정 단백질-핵공극 형성	48시간에서 상향

[0353]

[0354]

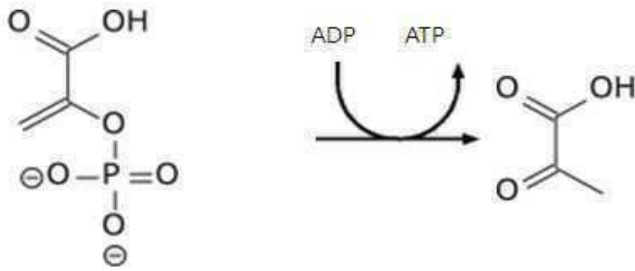
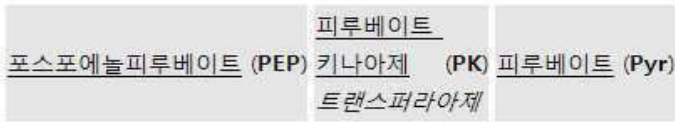
아실 CoA 티오에스테라제 7: 아실-CoA 티오에스테라제7(ACOT7)은 지방산 아실 CoA를 유리지방산과 CoA로 가수분해하는 반응에 촉매작용을 하는 효소 그룹의 일원이다. 그러므로 이 효소는 지방 대사와 세포 신호전달의 조절에 중요한 역할을 한다. ACOT7은 지방산 사슬의 탄소수가 8-16개(C8-C16)가 있는 고급 아실-CoA 기질을 선호한다. ACOT7의 정확한 세포에서의 기능은 온전히 이해되지 않았다. 스테롤 조절인자-결합 단백질 2에 의해 이 유전자 전사는 활성화되고 이는 콜레스테롤 대사에서의 기능을 시사한다.

[0355]

본 사례에서의 결과는 ACOT7가 Q10 대사에 직접적 또는 간접적으로 연관되어있을 가능성이 있음을 시사한다. 그러므로, ACOT7을 표적으로 삼는 것은 Q10의 세포간 수치 조절을 촉진할 수 있고 따라서 세포에서 Q10 효과에 영향을 미친다.

[0356]

피루브산 키나제: 피루브산 키나제는 해당작용의 후기단계에 관련된 효소이다. 이것은 포스포에놀피루브산(PEP)로부터 ADP로의 인산기 이동하여 피루브산 한 분자와 ATP 한 분자를 산출하는 반응을 촉매한다.



[0357]

[0358]

이 단백질은 미토콘드리아 농축 SK-MEL-28 샘플에서 확인된 타입 2 아형인 PKM2의 단백질로 추정된다. 이 아형은 암세포 형성과 조절과 연관이 있다고 잘 알려져 있다.

[0359]

미토콘드리아에서 Q10 수치 정량화

[0360]

최근 발표된 방법(Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175, 242-248)을 기반으로 양이온 모드에서 전자분무 이온화법(ESI)으로 LC-MS-MS를 통해 조효소 Q10(Q10)과 환원형 유비퀴놀-10(Q10H2)의 동시분석이 수행되었다. 이 방법을 통해 기타 선택된 지방의 감별과 동시에 Q10과 Q10H2 모두를 매우 선택적으로 감별하고 민감하게 정량하는 것이 가능하다. 100 μM Q10 처리된 SK-MEL-28의 미토콘드리아 농축 샘플 분취액이 단백질 침전, 액체-액체 추출, 건조상태로의 증발, 95:5 메탄올/헥산(부피/부피) 복원에 기반하여 일반적인 전처리되었다.

[0361]

이 분석에서 Q10, Q10H2, Q9가 정량화되었다(표 5). 관련 분자인 Q9의 수치가 낮았고 거의 탐지가 불가능 수준이었다. 처리되지 않은 샘플의 수치는 상대적으로 일관적이었고, 6시간 Q10 처리된 샘플과 같은 수준이었다. 전체 물질에서 샘플편차를 조절하기 위해서, 샘플 사이즈 에러에 의해 편차가 생기지 않았음을 확인하기 위해 콜레스테롤 수치도 측정되었다. Q10 수치가 같은 미토콘드리아 조제물의 다른 분취액의 단백질 추출물에서 얻어진 총 단백질 값에 대해 보정되었을 때, 상대적 비율이 비교되었다. 그 결과 Q10수치는 19시간(~3배)에 유의적으로 증가하였고, 48시간에는 훨씬 많이 증가되었다(~6배)(도면 12).

**표 5**

배지에서 100 μM Q10 처리된 SK-MEL-28 세포로부터 얻은 미토콘드리아 농축 샘플에 존재하는 Q10 수치 HPLC-MS 정량결과

파일	샘플	주입	피크 영역		ng/샘플			μg/샘플 콜레스테롤
			Q9	Q10	Q9	Q10	Q10H <sub>2</sub>	
081204-05	100 ng Std		245,342	352792				
081204-06	6 hr 가짜#1	10%	2560	32649	1.04	9.25		
081204-07	용매 블랭크#1	5 ul	3781	3174	1.54	0.9		
081204-08	용매 블랭크#2	5 ul	2396	4399	0.98	1.25		
081204-09	6 hr 가짜#2	20%	1572	36328	0.64	10.3		
081204-10	용매 블랭크#3	10 ul	1722	2504	0.7	0.71		
081204-11	48 hr Q10처리됨	20%	4879	164496	1.99	46.63	0.28	13.86
081204-12	48 hr 가짜	20%	2412	25552	0.98	7.24	0.05	13.04
081204-13	6 hr Q10처리됨	20%	692	25427	0.28	7.21		
081204-14	19 hr Q10처리됨	20%	1161	59164	0.47	16.77		
081204-15	19 hr 가짜	20%	901	19999	0.37	5.67		

[0362]

[0363]

[0364]

본 실험에서의 놀라운 결과는 Q10이 세포에 산화형으로 공급되었다는 것이다. 48시간 샘플에서, 환원형 Q10H2도

측정되었고 매우 낮은 양이 존재한다는 것이 확인되었다(CoQ10 샘플의 46.63ng에 비해 CoQ10H2 샘플 0.28ng). Q10 48시간 처리 샘플에서의 Q10H2 수치가 완화하게 증가(3배)했지만, 그 수치는 분석에서의 추정 검출한계에 가까웠다. 재미있게도, 산화형(Q10)은 생물학적 체계 내에서 산화 촉진제의 역할을 할 수 있었다. 문헌에 따르면, 인간 혈장에서 Q10과 Q10H2를 분석해 봤을 때, 분자의 대다수(90%)는 항산화제 역할을 할 수 있는 Q10H2의 환원형이었다(Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175, 242-248).

[0365] 그러므로, 이러한 결과로부터 외부로부터 Q10이 배지에 추가 유입됨에 따라 미토콘드리아에서 Q10의 수치가 증가함을 확인했다. 놀랍고 예측하지 못한 발견은 Q10이 공급된 산화형(산화촉진제)에서 유지되었고 Q10H2의 환원형(항산화제)로 어떠한 유의한 양만큼 변환되지 않았다는 점이다.

[0366] 실시예 6. 실시간 PCR 분석

[0367] 실험 1: 세포사멸 어레이

[0368] 위에 실시예 3에서 논의된 바와 같이, 암세포의 Q10 노출은 세포사멸 과정에 의해 암세포들이 사멸하는 비율을 높인다. Q10 반응에 연관된 단백질을 확인하기 위해, 세포사멸에 대한 표적 회로 어레이에 연관된 유전자/단백질에 대한 mRNA 수치의 변화를 확인하기 위해 실시간 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)법이 이루어졌다.

[0369] PCR 어레이를 스크리닝 도구로 사용하면서, 세포내 Q10의 생물학적 활동방식에 대한 이해를 도와줄 수 있는 분자 표적의 범위가 평가되었다. 80개 경로 특정 표적을 포함하는 사전에 선택된 서브세트의 mRNA 수치를 측정하기 위해 mRNA 수치의 변화는 실시간 PCR 정량법을 통해 분석되었다.

[0370] mRNA 결과를 해석하기 위해, mRNA 전사가 두 배 변화한 유전자를 확인하고 평가하였다. mRNA를 생산하기 위한 유전자 전사 수치를 통해서는 발현된 단백질 수치의 가능한 변화에 대한 대략적인 추정만이 가능하다. 노련한 사람은 각 mRNA가 분해된 정도가 다르거나 비효율적으로 번역이 되어서, 단백질 양이 다른 결과를 얻었음에 감사할 것이다.

[0371] 24시간 동안 50 μM Q10 처리된 SkBr-3 세포

[0372] 총 84개의 세포사멸 경로 관련 단백질에 대해서 mRNA 수치 변화를 측정하기 위해 RT-PCR 분석법이 이용되었다. Q10처리(24시간)된 SkBr3에 대한 실시간 PCR 세포사멸 분석 실험을 통해 다음의 mRNA가 영향을 받음을 확인하였다: Bcl2, Bcl2L1, Bcl2L11, Birc6, Bax, Xiap, Hprt1, Apaf1, Abl1, Braf. 이러한 결과는 암세포에 Q10 처리 시 세포사멸 반응이 일어난다는 증거를 또 다시 지지한다.

[0373] [표 6a]

심볼	상향 -하향 조절	유니진	Refseq	기재	명칭
BCL2L1	13.1957	Hs.516966	NM_138578	BCL2-1형	BCL-XL/S
BNIP2	6.3291	Hs.646490	NM_004330	BCL2/아데노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 2	BNIP-2/NIP2
BCL2	5.4717	Hs.150749	NM_000633	B-세포 CLL/림프종 2	Bcl-2
BIRC6	4.7966	Hs.150107	NM_016252	바콜로바이러스 IAP 반복체 함유 6 (아폴론)	APOLLON/BRUCE
BCL2L11	4.6012	Hs.469658	NM_006538	BCL2-11형 (아포토시스 촉진인자)	BAM/BIM
XIAP	4.3832	Hs.356076	NM_001167	아포토시스의* 연결된 억제제	API3/BIRC4
BRAF	4.3832	Hs.550061	NM_004333	V-raf 면역 육종 발암유전자 동족체 B1	B-raf 1/BRAF1
BAX	3.896	Hs.631546	NM_004324	BCL2-연합 X 단백질	Bax zeta
APAF1	2.6244	Hs.708112	NM_001160	아포토시스 펩티다제 활성화인자 1	CED4/DKFZp781B1145
HPRT1	-160.6748	Hs.412707	NM_000194	하이포산틴 포스포리보실트랜스퍼라제 1 (Lesch-Nyhan 증후군)	HGPRT/HPRT

[0374]



[0375] SK-MEL-28 세포에서 이루어진 3개의 개별시험에서의 일관된 결과는 아래 표 6B에 요약되어있다. 100 μM Q10 처리된 SCC 세포에서도 여러 유전자가 조절되었다. SCC 세포에서 조절되는 것으로 보이는 세포사멸 어레이에서의 유전자들이 표 7에 설명되어 있다. SK-MEL-28 세포와 SCC 세포에 있는 많은 유전자가 6시간에 조절되었음을 확인했다. 24시간쯤에는 조절이 감소되었다. SK-MEL-28 세포와 SCC 세포에서 모두 조절되는 유전자는 표 8에 설명되어 있다.

[0376] [표 6b]

아폽토시스 분석에 의해 분석되는 경우 100 μM Q10 치료에 의해 조절된 SK-MEL-28 세포에서의 유전자

심볼	기재	조절	위치	가능한 기능
ABL1	C-ab1 발암유전자 1, 수용체 티로신 키나제	72시간에 하향 조절됨	핵	티로신 키나제
BAG1	BCL2-연합된 아타노유전자	48시간에 상향 조절됨	세포질	항-아폽토시스, 글루코코르티코이드 수용체 경로
BCL2	B-세포 CLL/1림프종 2	48시간에 하향 조절됨	세포질	세포 사멸
BCL2A1	BCL2-관련 단백질 A1	48시간에 하향조절됨	세포질	카스파제를 조절함, TP73 인산화
BCL2L1	BCL2-1형	72시간에 하향 조절됨	세포질	카스파제 억제제
BCL2L10	BCL2-10형 (아폽토시스 촉진제)	48시간에 하향조절됨	세포질	카스파제 활성화인자
BCL2L11	BCL2-11형 (아폽토시스 촉진제)	48시간에 하향 조절됨	세포질	프로-아폽토시스 카스파제 3 활성화인자
BIRC3	바클로바이러스 IAP 반복체 함유 3	6시간에 하향조절됨	세포질	항-아폽토시스
BIRC8	바클로바이러스 IAP 반복체 함유 8	48시간에 하향 조절됨	세포질	카스파제를 활성화 시킴
CARD8	카스파제 채용 도메인 계열, 구성원 8	48시간에 하향조절됨	핵s	카스파제 활성화인자
CASP14	카스파제 14, 아폽토시스 관련 시스템인 펩티다제	48시간에 하향 조절됨	세포질	아폽토시스 관련 시스템인 펩티다제
CASP5	카스파제 5, 아폽토시스관련 시스템인 펩티다제	48시간에 하향조절됨	세포질	아폽토시스 관련 시스템인 펩티다제
CD40LG	CD40 리간드 (TNF 슈퍼패밀리; 구성원 5, 고-IgM 증후군)	48시간에 하향조절됨	세포외 공간	CD40 수용체 결합
CIDEA	세포 사멸 유도 DFFA-형 효능인자 a	48시간에 상향 조절됨	세포질	프로-아폽토시스

[0377]

FADD	사멸 도메인을 통한 Fas (TNFRSF6)-관련	6시간에 하향조절된	세포질	프로-아폽토시스
FAS	Fas (TNF 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 6)	48시간에 상향조절된	세포질막	프로-아폽토시스
FASLG	Fas 리간드 (TNF 슈퍼패밀리, 구성원 6)	48시간에 하향조절된	세포외 공간	프로-아폽토시스
GADD45A	성장 정지 및 DNA 손상 유도, 알파	48시간에 상향조절된	핵	성장 정지
HRK	Harakiri, BCL2 상호작용 단백질 (단지 BH3 도메인을 함유함)	48시간에 하향조절된	세포질	프로-아폽토시스
PYCARD	PYD 및 CARD 도메인 함유	6시간에 하향조절된	세포질	아폽토시스 프로테아제 활성화인자
TNF	종양 괴사 인자 (TNF 슈퍼패밀리, 구성원 2)	48시간에 상향조절되고 이어서 하향 조절된	세포외 공간	TNF 수용체 결합
TNFRSF10A	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 10a	48시간에 상향 조절됨에 이어서 하향조절된	세포질막	카스파제 활성화인자
TNFRSF10B	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 10b	72시간에 하향 조절된	세포질막	p53 시그널 전달 카스파제 활성화
TNFRSF1A	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	72시간에 하향 조절된	세포질막	프로-아폽토시스
TNFRSF21	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 21	48시간에 하향 조절된	세포질막	카스파제를 활성화 시킴
CD27	CD27 분자	48시간에 하향 조절된	세포질막	카스파제 억제제
TNFRSF9	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9	48시간에 하향 조절된	세포질막	프로-아폽토시스
TNFSF10	종양 괴사 인자 (리간드) 슈퍼패밀리, 구성원 10	48시간에 상향조절된	세포외 공간	프로-아폽토시스
TP73	종양 단백질 p73	48시간에 하향 조절된	핵	전사인자
TRAF3	TNF 수용체-연합된 인자 3	48시간에 하향 조절된	세포질	아연 핑거 도메인
TRAF4	TNF 수용체-연합된 인자 4	48시간에 하향 조절된	세포질	아연 핑거 도메인

[0378]

표 7

아폽토시스 어레이에 의해 분석되는 경우 100  $\mu$ M Q10 치료에 의해 조절되는 SCC 세포에서의 유전자

기호	기재	조절
AKT1	V-akt 쥐 홍선종 바이러스 발암유전자 동족체 1	6시간에 하향 조절됨에 이어서 24시간에 상향조절됨.
BAG4	BCL2-연합된 아타노유전자 4	24시간에 상향 조절됨.
BAX	BCL2-연합된 X 단백질	24시간에 상향 조절됨.
BCL2	B-세포 CLL/림프종 2	24시간에 상향 조절됨.
BCL2L1	BCL2-1형	6시간에 하향조절되고 이어서 24시간에 상향 조절됨.
BIRC3	바콜로바이러스 IAP 반복체 함유 3	6시간에 하향조절됨.
BNIP3	BCL2/아데노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 3	24시간에 하향조절됨.
CARD6	카스파제 채용 도메인 패밀리, 구성원 6	6시간에 하향조절됨.
CASP6	카스파제 6, 아폽토시스 관련 시스테인 펩티다제	24시간에 상향 조절됨.
CASP7	카스파제 7, 아폽토시스 관련 시스테인 펩티다제	24시간에 상향 조절됨.
CD40	CD40 분자, TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 5	6시간에 하향조절됨.
FADD	사멸 도메인을 통해 연합된 Fas (TNFRSF6)	24시간에 상향 조절됨.
GADD45A	성장 지지 및 DNA-손상-유도성, 알파	24시간에 상향 조절됨.
HRK	Harakiri, BCL2 상호작용 단백질 (단지 BH3 도메인 함유함)	24시간에 상향 조절됨.
TNFRSF21	종양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 21	6시간에 하향조절됨.
TNFRSF25	종양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 25	6시간에 하향조절되고 이어서 24시간에 상향 조절됨.
CD27	CD27 분자	6시간에 하향조절됨.
TNFRSF9	종양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9	6시간에 하향조절됨.
TNFSF10	종양 피사 인자 (리간드) 슈퍼패밀리, 구성원 10	24시간에 상향 조절됨.
CD70	CD70 분자	6시간에 하향조절됨.
TP53	종양 단백질 p53	24시간에 상향 조절됨.
TP73	종양 단백질 p73	6시간에 하향조절되고 이어서 24시간에 상향 조절됨.
TRAF2	TNF 수용체-연합된 인자 2	24시간에 상향 조절됨.

[0379]

표 8

SK-MEL-28 및 SCC 세포 둘 모두에서 100 μM Q10 치료로 조절된 아폽토시스  
어레이 기원의 유전자

기호	기재
BCL2	B-세포 CLL/림프종 2
BCL2L1	BCL2-1형 (Bcl-x1)
BIRC3	바콜로바이러스 IAP 반복체 함유 3
FADD	사멸 도메인을 통해 연합된 Fas (TNFRSF6)-
GADD45A	성장 정지 및 DNA-손상-유도성, 알파
TNFRSF21	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 21
CD27	CD27 분자
TNFRSF9	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 9
TNFRSF10	종양 괴사 인자 (리간드) 슈퍼패밀리, 구성원 10
TP73	종양 단백질 p73
TRAF2	TNF 수용체-연합된 인자 2

[0380]

[0381]

재미있게도, 변화된 mRNA 수치는 세포사멸 단백질들의 상당한 상향조절을 보여주었고, 그 중 Bcl-x1에서의 변화가 가장 컸다. SK-MEL-28 세포에서의 단백질 어레이 실험에서도 이러한 결과를 확인할 수 있었다.

[0382]

Bcl-x1은 미토콘드리아의 막횡단 분자이다(Bcl-x1은 "엄청 큰 기저 세포 종양"을 뜻한다). 이것은 FAS-L의 신호 변환 경로에 연관되고 단백질 Bcl-2 그룹의 멤버인 여러 세포사멸 단백질 중 하나이다. Bcl-x1은 암세포 생존에 연루되었음이 시사되어왔다. 그러나, 인간 Bcl-x mRNA의 선택적 재조합으로 최소 두 개의 별개 Bcl-x mRNA 중, Bcl-xL과 Bcl-xS가 생긴다고 알려져 있다. 우세한 단백질 산물(233 아미노산)은 큰 Bcl-xL mRNA, Bcl-xL이고 이것은 성장인자 철수에 따른 세포 죽음을 저해한다(Boise et al., 1993 . Cell 74, 597-608). 반면에 Bcl-xS는 세포 죽음을 저해하는 Bcl-2 기능을 저해하고 세포를 세포사멸 세포의 죽음에 좀 더 민감하게 만든다. 이 용된 분석법은 Bcl-x의 어떤 아형이 상향조절 되는지 구별하지 않았다. 이러한 실험에서 CoQ10에 의해 상향 조절된 Bcl-x 아형은 2개의 mRNA 재조합 아형(Bcl-xL 대 Bcl-sL)의 비율을 분석하기 위해 RT-PCR 법을 사용하는 것과 같이 일반에 알려진 일반적인 방법을 통해 밝혀질 수 있다.

[0383]

세포사멸 관련 단백질 조사로부터, 여러 세포사멸 촉진인자와 항 세포사멸 인자는 BCL-2 패밀리 또는 내에 있거나 발현 정도를 조절하였다(BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). 이러한 단백질들은 미토콘드리아 외막 침투를 관장한다.

[0384]

세포사멸 반응에 대한 초기 마커는 카스파아제 3/7 단백질에 의한 세포사멸을 사전에 관찰한 것과 일관되게 카스파아제-9(16시간)의 조절과 함께 관찰된다. 스트레스 신호전달 경로의 유도는 미토콘드리아에서 사이토크롬 c의 분비와 apaf-1(apoptosome)의 활성화를 야기하고, 이것은 결국 카스파아제 9의 효소 전구체를 활성화 형태로 쪼갬다. 일단 시작되면 카스파아제 9는 다른 세포사멸 경로를 촉진하기 위해 프로카스파아제-3과 프로카스파아제-7로 쪼개진다.

[0385]

조절되는 단백질의 종양괴사인자 수용체 군에 대해서 일관적인 연관성이 있다.

[0386]

암단백질 p73의 강한 하향조절 또한 주목되었다. 유방암 자궁암을 포함한 인간에서 통상적으로 발견되는 여러 암 분석은 상응하는 부위의 정상 조직과 비교했을 때 p73이 과발현됨을 보여주었다. 세포주기 조절과 포유류 세포의 DNS 합성(예, E2F-1)에 연관된 인체 내 전사 요소의 조절되지 않는 과발현이 p73 발현을 유도한다는 것이 최근의 연구 결과에서 시사되었다. 그 결과에서 P73이 종양단백질일 수 있지만 p53 단백질이 연관된 기전과 다른 기전을 가질 것이라고 제시되었다. 세포사멸 경로의 도식도가 도면 13에 나타나있다.

[0387]

SKMEL-28 세포

[0388]

세포사멸 관련 단백질 조사로부터, 여러 세포사멸 촉진인자와 항 세포사멸 인자는 BCL-2 패밀리 또는 내에 있거나 발현 정도를 조절하였다(BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). 이러한 단백질들은 미토콘드리아

아 외막 침투를 관장한다. 세포사멸 반응에 대한 초기 마커는 카스파아제 3/7 단백질에 의한 세포사멸을 사전에 관찰한 것과 일관되게 카스파아제-9(16시간)의 조절과 함께 관찰된다. 스트레스 신호전달 경로의 유도는 미토콘드리아에서 사이토크롬c의 분비와 apaf-1(apoptosome)의 활성화를 야기하고, 이것은 결국 카스파아제 9의 효소 전구체를 활성화 형으로 쪼갬다. 일단 시작되면 카스파아제 9는 다른 세포사멸 경로를 촉진하기 위해 프로카스파아제-3과 프로카스파아제-7로 쪼개진다.

표 9

100 μM A10을 사용하여 치료된 SKMEL-28 세포에 대한 mRNA 수준의 변화, 아포토시스 경로 주변에 초점된 RT-PCR 어레이에 의해 평가됨

Refseq	기재	기호	6시간 Q10	16 시간 Q10	24 시간 Q10	72 시간 Q10
NM_006538	BCL2- 11형 (아포토시스 촉진제)	BCL2L1	2.13	2.41	1.92	2.51
NM_000875	인슐린형 성장 인자 1 수용체	IGF1R	1.77	1.09	1.33	1.25
NM_004048	베타-2-마이크로 글로불린	B2M	1.74	1.76	1.58	3.11
NM_003921	B-세포 CLL/림프 종 10	BCL10	1.55	1.87	1.48	-3.11
NM_004330	BCL2/아테노바이리스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 2	BNIP2	1.46	1.51	1.57	-1.61
NM_005157	C-abl 발암유전자 1, 수용체 티로신 키나제	ABL1	1.42	2.77	-1.22	-2.03
NM_004323	BCL2-연합된 아타노유전자	BAG1	1.41	1.44	-1.61	-2.45
NM_001229	카스파제 9, 아포토시스 관련 시스테인 펩티다제	CASP9	1.32	3.96	1.83	1.14
NM_003806	Harakiri, BCL2 상호작용 단백질 (단지 BH3 도메인 함유함)	HRK	1.18	4.52	2.73	-1.14
NM_001924	성장 정지 및 DNA-손상-유도성, 알파	GADD45A	1.07	3.34	1.13	-2.36
NM_001188	BCL2-길항제/킬러 1	BAK1	1.06	2.73	-1.00	-4.54
NM_004295	TNF 수용체-연합된 인자 4	TRAF4	-1.91	2.63	-1.58	-740.66
NM_003842	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 10b	TNFRSF10B	-2.07	1.53	-1.81	-710.49
NM_000633	B-세포 CLL/림프 종 2	BCL2	-2.98	-1.63	-2.82	-11.36

[0389]

NM_001242	CD27 분자	CD27	-3.40	-2.38	-1.35	-12.72
NM_014430	세포 사멸 유도 DFFA-형 효능인자 b	CIDEB	-3.48	1.56	-3.69	-2.59
NM_001065	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	TNFRSF1A	-4.53	2.28	-3.30	1.22
NM_005427	종양 단백질 p73	TP73	-4.66	-9.80	-8.71	-26.96
NM_003844	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 10a	TNFRSF10A	-4.84	-5.26	-4.33	-11.84
NM_138578	BCL2-유사 1	BCL2L1	-4.94	-1.80	-6.17	-7.04
NM_001165	바클로바이러스 IAP 반복체 함유	BIRC3	-13.68	-1.98	-2.42	-3.42

[0390]

- [0391] 조절되는 단백질의 종양괴사인자 수용체 군에 대해서 일관적인 연관성이 있다.
- [0392] 암단백질 p73의 강한 하향조절 또한 주목되었다. 유방암 자궁암을 포함한 인간에서 통상적으로 발견되는 여러 암 분석은 상응하는 부위의 정상 조직과 비교했을 때 p73이 과발현됨을 보여주었다. 세포주기 조절과 포유류 세포의 DNS 합성(예, E2F-1)에 연관된 인체 내 전사 요소의 조절되지 않는 과발현이 p73 발현을 유도한다는 것이 최근의 연구 결과에서 시사되었다. 그 결과에서 P73이 종양단백질일 수 있지만 p53 단백질이 연관된 기전과 다른 기전을 가질 것이라고 제시되었다.
- [0393] 실험예 2: 산화 스트레스와 항산화 방어 어레이를 이용한 실시간 PCR 어레이
- [0394] Q10 반응에 연관된 단백질을 확인하기 위해, 산화 스트레스와 항산화 방어에 대한 표적 회로 어레이에 연관된 유전자/단백질에 대한 mRNA 수치 변화를 확인하기 위해 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)법이 이루어졌다.
- [0395] 아래 표 10에는 100 μM Q10 처리된 SK-MEL-28 세포에서 조절되는 유전자가 나열되어있다. 두 별개 시험에서 조절된 유전자에 대해서만 결과가 있다. 6시간에서 상당한 양의 유전자가 조절되었지만, RNA에서 가장 큰 변화는 48시간에서 볼 수 있었다.

**표 10**

산화성 스트레스 및 항산화성 방어 어레이에 나타낸 바와 같은 100 μM Q10 치료에 의해 조절되는 SK-MEL-28 세포

기호	기재	조절	위치	가능한 기능
ALB	알부민	48시간에 하향 조절	세포외 공간	캐리어 단백질, 항아포토시스
AOX1	알데하이드 옥시다제 1	16시간부터 상향 조절	세포질	유리 라디칼을 생성함, 약물 대사 과정.
APOE	아포지질단백질 E	48시간에 하향 조절	세포외 공간	지질 대사
ATOX1	ATX1 항산화 단백질 1 동족체 (효모)	48시간에 하향 조절	세포질	구리 대사
BNIP3	BCL2/아데노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 3	48시간에 하향 조절	세포질	항아포토시스
CSDE1	냉각 쇼크 도메인 함유 E1, RNA-결합	48시간에 하향 조절	세포질	전사 조절
CYBA	시토크롬 b-245, 알파 폴리펩타이드	48시간에 하향 조절	세포질	아포토시스
CYGB	세포글로빈	48시간에 하향 조절	세포질	피옥시다제, 수송체
DHCR24	24-테하이드로콜레스테롤 리덕타제	6시간에 하향 조절	세포질	전자 캐리어는 아포토시스에 관여하는 TP53에 결합함
DUOX1	이원 옥시다제 1	48시간에 상향 조절	세포질막	칼슘 이온 결합, 전자 캐리어
DUOX2	이원 옥시다제 2	48시간에 하향 조절	공지되지 않음	칼슘 이온 결합.
EPHX2	에폭사이드 하이드릴라제 2, 세포질	48시간에 하향 조절	세포질	아라키돈산 대사
EPX	호염기성 퍼옥시다제	48시간에 하향 조절	세포질	페닐 알라닌 대사, 아포토시스.
GPX2	글루타티온 퍼옥시다제 2 (위장)	48시간에 하향 조절	세포질	전자 캐리어는 아포토시스에 관여하는 TP53에 결합한다
GPX3	글루타티온 퍼옥시다제 3 (혈장)	48시간에 상향 조절	세포외 공간	아라키돈산 대사, 암종에서 상향 조절됨
GPX5	글루타티온 퍼옥시다제 5 (부고환 안드로젠 관련 단백질)	48시간에 상향 조절	세포외 공간	아라키돈산 대사

[0396]

GPX6	글루타티온 퍼옥시다제 6 (후각)	48시간에 하향 조절	세포외 공간	아라키돈산 대사
GSR	글루타티온 리덕타제	48시간에 하향 조절	세포질	글루타메이트 및 글루타티온 대사, 아포토시스.
GTF2I	일반 전사인자 II, i	6시간에 하향 조절	핵	전사 활성화인자, fos의 전사.
KRT1	케라틴 1 (표피 용해 과각화증)	48시간에 상향 조절	세포질	당 결합.
LPO	락토퍼옥시다제	48시간에 하향 조절	세포외 공간	페닐 알라닌 대사
MBL2	만노스-결합 렉틴 (단백질 C) 2, 가용성 (옵소닌 결합)	48시간에 하향 조절	세포외 공간	보체 시그널 전달, 수용체내 시그널 전달 패턴.
MGST3	마이크로솜 글루타티온 S-트랜스퍼라제 3	16시간에 상향조절	세포질	제노바이오틱 대사
MPO	골수퍼옥시다제	48시간에 하향 조절	세포질	항아포토시스, 페닐 알라닌 대사
MPV17	MpV17 미토콘드리아 내부 막 단백질	6시간에 하향 조절	세포질	미토콘드리아 DNA의 유지
MT3	메탈로티오네인 3	48시간에 하향 조절	세포질	구리 이온 결합.
NCF1	호중구 사이토졸인자 1, (만성 육아종성 질환, 오토즘 1)	6시간부터 하향조절	세포질	유리 라디칼을 생성함.
NCF2	호중구 사이토졸인자 2 (65kDa, 만성 육아종성 질환, 오토즘 2)	48시간에 상향 조절	세포질	전자 캐리어.
NME5	비전이성 세포 5, 단백질 발현 (뉴클레오사이드-디포스파타제 키나제)	48시간에 하향 조절	공지되지 않음	키나제, 퓨린 및 피리미딘 대사
NOS2A	산화질소 신타제 2A (유도성, 간 세포)	48시간에 하향 조절	세포질	글루코코르티코이드 수용체 시그널 전달, 아포토시스.
OXR1	산화 내성 1	48시간에 하향 조절	세포질	산화성 스트레스에 응답함.
PDLIM1	PDZ 및 LIM 도메인 1 (elfin)	48시간에 상향 조절	세포질	전사 활성화인자.

[0397]

PIP3-E	포스포이노시티드-결합 단백질 PIP3-E	48시간에 하향 조절	세포질	퍼옥시다제.
PRDX2	퍼옥시레독신 2	6시간에 하향 조절	세포질	페닐 알라닌 대사에 역할 세포 사멸에서의 역할
PRDX4	퍼옥시레독신 4	24시간부터 하향 조절	세포질	티오레독신 퍼옥시다제.
PREX1	포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트-의존성 RAC 교환제 1	48시간에 하향 조절	세포질	산소 유리 라디칼 형성
PRG3	프로테오글리칸 3	48시간에 하향 조절	세포의 공간	세포사멸에서의역할
PTGS1	프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드신타제 1 (프로스타글란딘 G/H 신타제 및 사이클로옥시게나제)	48시간에 하향 조절	세포질	아라키돈산 대사, 프로스타글란딘 합성.
PTGS2	프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드신타제 2 (프로스타글란딘 G/H 신타제 및사이클로옥시게나제)	48시간에 상향 조절	세포질	아라키돈산 대사, 프로스타글란딘 합성.
PXDN	퍼옥시다신 동족체 (드로소필라)	48시간에 상향 조절	공지되지 않음	TRAF4에 결합함, 칼슘 이온 결합, 철 이온 결합.
PXDNL	퍼옥시다신 동족체 (드로소필라)-형	48시간에 하향 조절	공지되지 않음	퍼옥시다제, 칼슘 이온 결합, 철 이온 결합.
RNF7	고리 핑거 단백질 7	16시간에 상향 조절	핵	아포토시스 구리 이온 결합, 유비퀴틴 경로.
SGK2	혈청/글루코코르티코이드 조절된 키나제 2	48시간에 하향 조절	세포질	키나제, 칼륨 채널 조절 인자.
SIRT2	시르투인 (사일런트 메이팅 타임 정보 조절 2 동족체) 2 (에스. 세레비지에)	16시간에 상향 조절	핵	전사인자.

[0398]



SOD1	슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1, 가용성 (근위축성 측삭 경화증 1 (성인))	16시간에 상향 조절	세포질	아포토시스 카스파제 활성화인자.
SOD2	슈퍼옥사이드 디스뮤타제 2, 미토콘드리아	16시간에 상향 조절	세포질	TNF 에 의해 조절된 아포토시스
SOD3	슈퍼옥사이드 디스뮤타제 3, 세포외	48시간에 하향 조절	세포외 공간	프로-아포토시스
SRXN1	셀프레독신 1 동족체 (예스, 세레비지애)	48시간에 하향 조절	세포질	DNA 결합, 옥시도리덕타제
TPO	갑상선 퍼옥시다제	48시간에 하향 조절	세포질막	티로글로불린의 요오드화, 티로신 대사, 페닐알라닌 대사
TTN	티틴	48시간에 하향 조절	세포질	액틴 세포골격 시그널 전달, 인테그린 시그널 전달
TXNDC2	티오레독신 도메인-함유 2 (스페르마토조아)	48시간에 하향 조절	세포질	피리미딘 대사

[0399]

[0400]

호중구 기질인자 2(NCF2, 65kDa, 만성육아종, 상염색체 2)는 가장 처음 유도된 mRNA 중 하나이다(6시간 때 관찰). 그 후 16시간대와 그 뒤로, 호중구 기질 인자 1(NCF1)(만성육아종, 상염색체 1)이 최초 유도기 후 매우 높은 수준으로 유도되었다.

[0401]

호중구 기질 인자 2는 호중구에서 쉽게 발견되는 NADPH라고 알려진 복합 단백질 구조물의 기질이다. 이 산화효소는 호중구 식체의 루멘으로 운반되는 많은 양의 초과산화물을 생산한다.

[0402]

NADPH 산화효소 (니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산-산화효소)는 막결합 효소 복합체이다. 이것은 원형질막과 식체의 막에서 발견할 수 있다. 이것은 6개의 하위단위로 구성되어 있다. 하위단위는 다음과 같다:

[0403]

Rho 구아노신 트리포스파타제 (GTPase), 일반적으로 Rac1 또는 Rac2 (Rac은 Rho-연관 C3 보툴리눔 독소 기질을 의미한다)

[0404]

5개 "phox" 단위 (Phox는 포식세포 항산화제를 의미한다)

[0405]

P91-PHOX (헵 포함)

[0406]

p22phox

[0407]

p40phox

[0408]

p47phox (NCF1)

[0409]

p67phox (NCF2)

[0410]

또 다른 NADPH 산화효소 수치는 변하지 않음이 관찰되었다. 그 효소는 새로운 NADPH 산화효소로 초과산화물을 생성하고 Ca(2+)-의존적 방법에서 H<sup>+</sup> 채널로서 기능을 하는 NOX5이다.

[0411]

또한 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트-의존적 RAC 교환체 1(PREX1) 역시 상향조절되었다. 이 단백질은 작은 GTP-결합 단백질(RACs)의 RHO군에서 구아닌 뉴클레오티드 교환인자로서의 역할을 한다. 이 단백질은 RAC1에 결합하고 결합 GDP를 유리 GTP로 교환함으로써 RAC1을 활성화시킨다. 주로 세포질에서 찾을 수 있는 이 암호화된 단백질은 포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리포스페이트와 헤테로트라이머릭 G 단백질의 베타-감마 하위단위에 의해 활성화된다.

[0412]

초기에 유도된 단백질 중 두 번째 많은 것은 산화질소 합성효소 2A(유도효소, 간세포)(NOS2A). 산화질소는 신경전달과 항균, 항암 작용을 포함한 여러 과정에서 생물학적 매개체로 작용하는 활성 자유기이다. 이 유전자는 간에서 발견되는 산화질소 합성효소를 암호화하고 특정 사이토카인과 지질다당류의 복합체에 의해 유도 가능하다.

[0413]

과산화물 제거효소 2, 미토콘드리아 (SOD2)는 철/망간 과산화물 제거효소군에 속한다. 이것은 호모테트라머를

형성하고 서브유니트당 망간이온 하나를 결합시키는 미토콘드리아 단백질을 암호화한다. 이 단백질은 산화적 인산화의 초과산화 부산물에 결합하고 그것을 과산화 수소와 이원자 산소로 변화시킨다. 이 유전자에 있는 돌연변이는 특발성 심근증(IDC), 조로, 산발적 운동신경 질병, 암에 연관되어 있다.

[0414] 하향 조절된 단백질의 한 예가 포크헤드 박스 M1(FOXM1)이고, 이것은 내인성 FOXM1 발현이 S와 G2/M기에서 최고조일 때 세포주기에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 최근의 연구에서 FOXM1이 P1k1, 사이클린 B2, Nek2, CENPF와 같은 G2/M 특이 유전자의 다양한 집합체의 발현을 조절하고 염색체 분리와 게놈의 안정성 유지에 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다. FOXM1 유전자는 현재 인간의 암유전자 전구체로 알려져 있다. FOXM1의 이상 상향조절은 기저세포 종양(BCC)의 악성종양형성과 연관이 있다. 따라서 간, 유방, 폐, 전립선, 자궁경부, 직장, 췌장, 뇌를 포함한 인간 고형암의 대부분에서 FOXM1이 상향조절되어 있음이 발견된다.

[0415] SKMEL-28 세포

[0416] SKMEL-28 세포를 이용하여 추가 실험이 행해졌다. 100 μM Q10 처리된 SKMEL-28 세포에 있는 mRNA 수치는 처리되지 않은 세포에서의 수치와 다양한 시간대에서 실시간 PCR 법(RT-PCR)을 이용하여 비교되었다. PCR 어레이(SABiosciences) 적절한 RNA 품질관리 뿐만 아니라 최적화된 실시간 PCR 프라이머 분석. PCR 어레이 분석에는 실시간 PCR의 민감도와 마이크로 어레이의 여러 유전자 프로파일링 능력이 있고, 유전자 발현 분석을 수행한다.

표 11

산화 스트레스와 항산화 방어 PCR 어레이에서 분석된 mRNA 수치 나열과 분류. SKMEL-28 세포에 100 μM Q10 처리 6시간 후, 단백질 코드를 강조함으로써 mRNA의 큰 변화를 표시 (증가-선명; 감소-밑줄; 또는 변화없음-회색)

<b>항산화제:</b>	
<b>글루타티온 피록시다아제(GPx):</b>	GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSTZ1.
<b>페록시글록신(TPx):</b>	PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6.
<b>기타 피록시다아제:</b>	CAT, <u>GPX1</u> , CYGB, <u>DUOX1</u> , <u>DUOX2</u> , EPX, <u>GPR156</u> , LPO, MPO, PIP3-E, PTGS1, PTGS2, PXDN, PxDNL, TPO, TTN.
<b>기타 항산화제:</b>	ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNDC2, TXNRD1, TXNRD2.
<b>반응성 산소종(ORS) 대사에 관련된 유전자:</b>	
<b>슈퍼옥시드 디스무타아제(SOD):</b>	SOD1, <u>SOD2</u> , SOD3.
<b>슈퍼옥시드 대사에 관련된 기타 유전자:</b>	ALOX12, CCS, CYBA, DUOX1, DUOX2, <u>GPX1</u> , MT3, NCF1, NCF2, NOS2A, NOX5, <u>TRFX1</u> , PRG3.
<b>ROS 대사에 관련된 기타 유전자:</b>	AOX1, BNIP3, <u>EPHX2</u> , MPV17, SFTPD.
<b>산화 스트레스 반응성 유전자:</b>	ANGPTL7, APOE, ATOX1, CAT, CCL5, <u>GPX1</u> , CYGB, DGKK, DHCR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1, EPX, FOXM1, GLRX2, <u>GPR156</u> , GPX1, <u>GPX2</u> , GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSS, KRT1, LPO, MBL2, MPO, MSRA, <u>MT3</u> , NME5, NUDT1, OXR1, OXSR1, PDLIM1, PIP3-E, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6, PRNP, RNF7, SCARA3, SELS, SEPP1, SGK2, SIRT2, SOD1, <u>SOD2</u> , SRXN1, STK25, TPO, TTN, TXNRD2.

[0417]

표 12

SKMEL-28의 100  $\mu$ M 치료의 시간 경과에 따른 평가. mRNA 수준 변화는 RT-PCR로 모니터링하고 산화성 스트레스 및 항산화제 방어 단백질 어레이를 평가하였다.

Refseq	기호	기재	6시간 Q10	16시 간 Q10	24 시 간 Q10	48시간 Q10	72 시 간 Q10
NM_000265	NCF1	호중구 사이토졸 인자 1, (만성 육아종성 질환, 오토좀 1)	0	높음	3.382 9	15.783 8	31.536 9
NM_012423	RPL13A	리보솜 단백질 L13a	-0.902 5	3.185 7	2.549 2	4.9253	7.82
NM_020820	PREX1	포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트-의존성 RAC 교환제 1	-3.297 1	2.867	0.322 2	6.3719	7.476
NM_012237	SIRT2	시르투인 (사일런트 메이팅 유형 정보 조절 2 동족제) 2 (에스.세레비지에)	-0.902 5	4.082 9	4.476 6	5.7166	6.6257
NM_005125	CCS	슈퍼옥사이드 디스뮤타제 에 대한 구리 샤페론	-0.620 6	3.007 7	3.452	2.9801	6.1539
NM_181652	PRDX5	퍼옥시레독신 5	-2.995	3.045 4	3.538 1	4.7955	6.0169
NM_016276	SGK2	혈청/글루코코르티코이드 조절된 키나제 2	0	0	0	0.5995	5.937
NM_003551	NME5	(뉴클레오사이드-디포스페이트 키나제) 에서발현되는 비-전이성 세포 5, 단백질	-0.665 2	3.113 8	3.369 4	3.1549	5.782
NM_004417	DUSP1	이원 특이성 포스파타제 1	-0.699 8	0.590 2	2.771 3	3.321	5.5375
NM_001752	CAT	카탈라제	-0.858 9	2.842 4	0.104 6	3.8557	5.3988

[0418]

NM_000041	APOE	아포지질단백질 E	-0.821 2	3.206 9	-0.95 43	3.7694	5.3315
NM_000101	CYBA	시토크롬 b-245, 알파 폴리펩타이드	-0.394 5	4.347 5	3.920 8	6.2452	5.0762
NM_000433	NCF2	호중구 사이토졸 인자 2 (65kDa, 만성 육아종성 질환, 오토즘 2)	1.2266	3.007 7	0.095 4	5.476	0
NM_000963	PTGS2	프로스타글란딘-엔도피옥사이드 신다제 2 (프로스타글란딘 G/H 신다제 및 사이클로옥시게나제)	-0.691 2	2.704 6	2.655 2	4.0553	-3.302 2
NM_183079	PRNP	프리온 단백질 (p27-30) (크루츠펠트-야코브(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 게르스트만-스트라우슬러-체인키(Gerstmann-Strausler-Scheinker) 증후군, 태아 가계성 불면증)	-0.214 4	3.523 6	2.908 6	5.0837	-3.939 6
NM_004052	BNIP3	BCL2/아테노바이러스 E1B 19kDa 상호작용 단백질 3	-2.937 6	3.328 8	4.312	-18.20 69	-4.842 4
NM_000242	MBL2	만노스-결합 렉틴 (단백질 C) 2, 가용성 (흡소닌 결합)	-0.362 2	-1.90 72	-3.01 42	-1.185 4	-6.454 4
NM_021953	FOXO1	Forkhead box M1	-0.813 5	0.068	-0.92 16	3.3655	-10.09 53

[0419]

[0420]

호중구 기질 인자 2(NCF2, 65kDa, 만성육아종, 상염색체 2)는 가장 처음 유도된 mRNA 중 하나이다(6시간 때 관찰). 그 후 16시간대와 그 뒤로, 호중구 기질 인자 1(NCF1)(만성육아종, 상염색체 1)이 최초 유도기 후 매우 높은 수준으로 유도되었다.

[0421]

호중구 기질 인자 2는 호중구에서 쉽게 발견되는 NADPH라고 알려진 복합 단백질 구조물의 기질이다. 이 산화효소는 호중구 식체의 루멘으로 운반되는 많은 양의 초과산화물을 생산한다. NADPH 산화효소 (니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산-산화효소)는 막결합 효소 복합체이다. 이것은 원형질막과 식체의 막에서 발견할 수 있다. 이것은 6개의 하위단위로 구성되어 있다. 하위단위는 다음과 같다:

[0422]

Rho 구아노신 트리포스파타제 (GTPase), 일반적으로 Rac1 또는 Rac2 (Rac은 Rho-연관 C3 보툴리눔 독소 기질을 의미한다)

[0423]

5개 "phox" 단위 (Phox는 포식세포 항산화제를 의미한다)

[0424]

P91-PHOX (헴 포함)

[0425]

p22phox

[0426]

p40phox

[0427]

p47phox (NCF1)

[0428]

p67phox (NCF2)

[0429]

또 다른 NADPH 산화효소 수치는 변하지 않음이 관찰되었다. 그 효소는 새로운 NADPH 산화효소로 초과산화물을 생성하고 Ca(2+)-의존적 방법에서 H<sup>+</sup> 채널로서 기능을 하는 NOX5 이다.

[0430]

또한 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트-의존적 RAC 교환체 1(PREX1) 역시 상향조절되었다. 이 단백질은 작은 GTP-결합 단백질(RACs)의 RHO군에서 구아닌 뉴클레오티드 교환인자로서의 역할을 한다. 이 단백질은 RAC1

에 결합하고 결합 GDP를 유리 GTP로 교환함으로써 RAC1을 활성화시킨다. 주로 세포질에서 찾을 수 있는 이 암호화된 단백질은 포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리포스페이트와 헤테로트라이머릭 G 단백질의 베타-감마 하위단위에 의해 활성화된다.

[0431] 초기에 유도된 단백질 중 두 번째 많은 것은 산화질소 합성효소 2A(유도효소, 간세포)(NOS2A). 산화질소는 신경 전달과 항균, 항암 작용을 포함한 여러 과정에서 생물학적 매개체로 작용하는 활성 자유기이다. 이 유전자는 간에서 발견되는 산화질소 합성효소를 암호화하고 특정 사이토카인과 지질다당류의 복합체에 의해 유도 가능하다.

[0432] 하향 조절된 단백질의 한 예가 포크헤드 박스 M1(FOXM1)이고, 이것은 내인성 FOXM1 발현이 S와 G2/M기에서 최고조일 때 세포주기에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 최근의 연구에서 FOXM1이 P1k1, 사이클린 B2, Nek2, CENPF와 같은 G2/M 특이 유전자의 다양한 집합체의 발현을 조절하고 염색체 분리와 게놈의 안정성 유지에 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다. FOXM1 유전자는 현재 인간의 암유전자 전구체로 알려져 있다. FOXM1의 이상 상향조절은 기저세포 종양(BCC)의 악성종양형성과 연관이 있다. 따라서 간, 유방, 폐, 전립선, 자궁경부, 직장, 췌장, 뇌를 포함한 인간 고형암의 대부분에서 FOXM1이 상향조절되어 있음이 발견된다.

[0433] 실험예 3: 열충격 어레이를 이용한 실시간 PCR

[0434] SCC 세포가 열충격 어레이되었고 조절된 유전자에 대한 데이터는 아래 표 13에 요약되어있다.

표 13

SCC 세포에서 100 μM Q10 치료로 조절된 열 쇼크 단백질 어레이 기원의 유전자

기호	기재	조절	위치	가능한 기능
CCT6B	TCP1, 서브유닛 6B (제타 2)를 함유하는 샤페로닌	24시간에 하향 조절된	세포질	단백질 폴딩 및 단백질 복합체 어셈블리
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) 동족체, 슈퍼패밀리 A, 구성원 1	6시간에 상향 조절된	핵	DNA 손상 및 단백질 폴딩 변화에 응답함
DNAJB13	DnaJ (Hsp40) 관련됨, 서브패밀리 B, 구성원 13	6시간에 하향 조절된.	공지되지 않음	단백질 폴딩 및 아포토시스.
DNAJB5	DnaJ (Hsp40) 동족체, 서브패밀리 B, 구성원 5	6시간에 하향 조절된.	공지되지 않음	단백질 폴딩 및 단백질 복합체 어셈블리중에 관여하는 HSP 에 결합함
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) 동족체, 서브패밀리 C, 구성원 12	6시간에 하향 조절된.	공지되지 않음	단백질 폴딩 및 단백질 복합체 어셈블리에 관여하는 HSP에 결합함.
DNAJC4	DnaJ (Hsp40) 동족체, 서브패밀리 C, 구성원 4	6시간에 하향 조절된.	세포질	단백질 폴딩 및 단백질 복합체에 광여하는 HSP 에 결합함
DNAJC5B	DnaJ (Hsp40) 동족체, 서브패밀리 C, 구성원 5 베타	6시간에 하향 조절된.	공지되지 않음	단백질 폴딩에 관여하는 단백질 폴딩의 변화에 응답함
HSPA8	열 쇼크 70kDa 단백질 8	6시간에 상향 조절된.	세포질	TNF를조절함, 아포토시스에 관여하는 BAG1, STUB1, TP53에 결합함
HSPH1	열 쇼크 105kDa/110kDa 단백질 1	6시간에 상향 조절된.	세포질	단백질 폴딩에 중요한 HSPA8에 결합함, 단백질 언폴딩 및 스트레스에 응답함

[0435]

[0436] 실험예 4: 당뇨병 어레이를 이용한 실시간 PCR

[0437] Q10이 다양한 유전자에 영향을 주고 세포의 대사상태를 변화시킬 수 있다는 전체적인 가설을 시험하기 위해 본 사례에서 설명된 실험들을 진행하였다. Q10을 100  $\mu$ M 처리한 SK-MEL-28 세포의 mRNA를 당뇨병과 그 이전에 관련된 표적 단백질로 구성된 패널을 사용하여 RT-PCR방법을 통해 평가하였다. 본 시험 결과, 당분해 작용기전과 인슐린 진행과정에 관련된 몇몇 단백질의 mRNA 발현 수준이 변화된 것을 발견하였다. (표 14에 요약하였음)

표 14

16시간동안 100  $\mu$ M Q10 을 사용하여 치료된 SKMEL-28 세포에 대한 주요 mRNA 수준

Refseq	기재	기호	16시간 후 배수 변화 (100 $\mu$ M Q10)
NM_000162	글루코 키나제 (헥소 키나제 4)	GCK	8.5386
NM_178849	간세포 핵 인자 4, 알파	HNF4A	8.421
NM_005249	포크헤드 박스 G1	FOXG1	4.6396
NM_000599	인슐린형 성장 인자 결합 단백질 5	IGFBP5	2.2721
NM_001101	액틴, 베타	ACTB	-2.0936
NM_002863	포스포릴라제, 글리코겐; 간 (Hers 질환, 글리코겐 저장 질환 유형 VI)	PYGL	-2.65
NM_001065	중양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	TNFRSF1A	-2.8011
NM_021158	트리블 동족체 3 (드로소필라)	TRIB3	-2.8011
NM_003749	인슐린 수용체 기질 2	IRS2	-2.9404
NM_004578	RAB4A, 구성원 RAS 발암유전자 패밀리	RAB4A	-3.1296
NM_004176	스테롤 조절 요소 결합 전사인자 1	SREBF1	-3.5455
NM_004969	인슐린-분해 효소	IDE	-4.4878
NM_005026	포스포이노시티드-3-키나제, 촉매성, 델타 폴리펩타이드	PIK3CD	-6.8971
NM_000208	인슐린 수용체	INSR	-8.6099
NM_003376	혈관 내피 성장 인자 A	VEGFA	-15.5194
NM_001315	미토겐-활성화된 단백질 키나제 14	MAPK14	-74.3366

[0438]

[0439] 본 초기 시험결과는 인슐린과 관련된 다양한 단백질의 mRNA 발현수준이 양방향으로 조절되었음을 보여주고 있다. 본 결과는 Q10이 당뇨병 치료 및 평가에 영향을 줄 수 있음을 나타내고 있다.

[0440] Q10을 처리한 SK-MEL-28 세포에서 얻은 결과를 확인하기 위해 추가적인 시험을 진행하였다. Q10을 처리한 이후 6시간에 SK-MEL-28 세포의 많은 유전자의 발현이 조절되었다. 하지만 16시간제와 24시간제에는 초기 조절이 덜 명확하게 바뀌었다. 약 48시간제에는 당뇨병과 관련된 많은 유전자의 발현이 강하게 조절되는 것을 발견하였다. 2개 이상의 독립적인 시험들로부터 얻은 일관된 결과를 표 15에 정리하였다. Q10을 처리한 SCC 세포도 처리 후 6시간제와 24시간제에 어떤 유전자의 발현이 조절되는 것을 보여주는 것 같았다. SCC 세포에 대한 결과는 표 16에 정리하였으며, SK-MEL-28 세포와 SCC 세포 모두에서 발현이 조절된 유전자에 대한 결과는 표17에 정리하였다.

표 15

당뇨병 어레이에 의해 분석되는 경우 100 μM Q10 치료에 의해 조절되는 SK-MEL-28

세포에서의 유전자

기호	기재	조절	위치	가능한 기능
ADRB3	아드레날린성, 베타-3-, 수용체	48시간에 하향 조절된	세포질막	cAMP 시그널 전달, G-단백질 시그널 전달
CEACAM1	암배아성 항원-관련 세포 접착 분자 1 (담즙 당 단백질)	48시간에 하향 조절된	세포외 공간	항아포토시스, 혈관신생의 양성 조절.
CEBPA	CCAAT/인핸서 결합 단백질 (C/EBP), 알파	48시간에 상향 조절	핵	글루코코르티코이드 수용체 시그널 전달, VDR/RXR 활성화
CTLA4	세포독성 T-림프구-연합 단백질 4	48시간에 하향 조절된	세포질막	T 세포 수용체 시그널 전달은 CASP8를 활성화시킨다.
DUSP4	이원 특이성 포스파타제 4	48시간에 하향 조절된	핵	포스파타제
ENPP1	엑트뉴클레오타이드는파이로포스파타제/포스포디에스테라제 1	48시간에 하향 조절된	세포질막	인슐린 수용체 경로의 음성 조절인자
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, 간충적 forkhead 1)	48시간에 하향 조절된	핵	항아포토시스, 전사인자
G6PD	글루코스 -6-포스페이트 데하이드로게나제	48시간에 상향 조절에 이어서 하향 조절	세포질	펜토스 포스페이트 경로, 글루타티온 대사
HMOX1	헴 옥시게나제 (탈사이클링) 1	48시간에 하향 조절된	세포질	헴 옥시게나제 탈사이클링
ICAM1	세포내 접착 분자 1 (CD54), 사람 리노바이러스 수용체	48시간에 하향 조절된	세포질막	아토바스타틴에 의해 조절됨, 몇몇 카스파제를 프로세싱.
IL4R	인터류킨 4 수용체	48시간에 하향 조절된	세포질막	TP73에 의한 상향 조절, IRS1 및 IRS2에 결합함
IRS1	인슐린 수용체 기질 1	48시간에 상향 조절됨에 이어서 하향 조절됨	세포질막	인슐린 수용체에 결합함
IRS2	인슐린 수용체 기질 2	48시간에 하향 조절된	세포질막	IGF-1 시그널 전달
NSF	N-에틸말레이미드-민감성 인자	48시간에 하향 조절된	세포질	GABA 시그널 전달
PIK3CD	포스포이노시티드-3-키나제, 족매, 델타 폴리펩타이드	48시간에 하향 조절된	세포질	키나제

[0441]

PPARG	퍼옥시좀 증식인자 활성화 화된 수용체 감마	48시간에 하향 조절됨	핵	전사 인자
PRKCB1	단백질 키나제 C, 베타 1	48시간에 하향 조절됨	세포질	PKC 계열
SELL	셀렉틴 L (림프구 접착 분자 1)	48시간에 하향 조절됨	세포질막	RAS, MAPK를 활성화 시키킴
SREBF1	스테롤 조절 요소 결합 전사인자 1	48시간에 상향조 절됨에 이어서 하향 조절됨	핵	전사 인자
STXBP1	신타신 결합 단백질 1	48시간에 하향 조절됨	세포질	마이엘린 풍부 분 획물으로 존재함
TGFB1	형질전환 성장 인자, 베타 1	48시간에 상향조 절됨에 이어서 하향 조절됨	세포외 공 간	프로-아포토시스
NKX2-1	NK2 호메오박스 1	48시간에 하향 조절됨	핵	전사 활성화인자
TNF	중양 피사 인자 (TNF 슈 퍼패밀리, 구성원 2)	48시간에 상향조 절됨	세포외 공 간	프로-아포토시스
TNFRSF1A	중양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	72시간에 하향 조절됨	세포질막	프로-아포토시스
VEGFA	혈관 내피 성장 인자 A	58시간에 상향조 절됨에 이어서 하향 조절됨	세포질	키나제

[0442]

표 16

당뇨병 어레이에 의해 분석되는 경우 100 μM Q10 치료에 의해 조절된 SCC 세포에서  
의 유전자

기호	기재	조절
G6PD	글루코스 -6-포스페이트 데하이드로게나제	6시간에 하향조절됨.
ICAM1	세포내 접착 분자 1 (CD54), 사람 리노바이러 스 수용체	6시간에 하향조절됨.
INPPL1	이노시톨 폴리포스페이트 포스파타제-1형	6시간에 하향조절됨.
NOS3	산화질소 신타제 3 (내피 세포)	6시간에 하향조절됨.
PIK3CD	포스포이노시티드-3-키나제, 촉매, 델타 폴리 펩타이드	6시간에 하향조절됨.
PPARA	퍼옥시좀 증식 활성화된 수용체, 알파	6시간에 하향조절됨.
PYGL	포스포릴라제, 글리코겐; 간 (Hers 질환, 글리 코겐 저장 질환 IV형)	6시간에 하향조절됨.
SREBF1	스테롤 조절 요소 결합 전사인자 1	6시간에 하향조절됨.
STXBP2	신타신 결합 단백질 2	6시간에 하향조절됨.
TNF	중양 피사 인자 (TNF 슈퍼패밀리, 구성원 2)	6시간에 하향조절됨.
TNFRSF1A	중양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	6시간 및 24시간에 하 향조절됨
VEGFA	혈관 내피 성장 인자 A	6시간에 하향조절됨.

[0443]



표 17

SK-MEL-28 및 SCC 세포 둘 모두에 대한 100  $\mu$ M Q10 치료로 조절된 당뇨병 어레이로부터 유전자.

기호	기재
G6PD	글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제
ICAM1	세포내 접착 분자 1 (CD54), 사람 리노바이러스 수용체
PIK3CD	포스포이노시티드-3-키나제, 촉매, 델타 폴리펩타이드
SREBF1	스테롤 조절 요소 결합 전사인자 1
TNF	종양 괴사 인자 (TNF 슈퍼패밀리, 구성원 2)
TNFRSF1A	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A
VEGFA	혈관 내피 성장 인자 A

[0444]

[0445]

[0446]

[0447]

[0448]

[0449]

[0450]

다양한 인슐린 관련 단백질의 mRNA 발현 수준은 양방향으로 조절되었다. Q10은 세포의 대사조절에 영향을 주며, 따라서 당뇨병과 같이 대사가 조절되지 못하는 질병에 영향을 준다.

**유사분열제 활성화된 단백질 키나제 14 (MAPK14):** 유사분열제 활성화된 단백질 키나제 14 (MAPK14)는 MAP 키나제 군에 속한다. MAP 키나제는 다양한 생화학적 신호를 통합하는 역할을 하며 분화, 분열, 전사 조절 및 발생과 같은 매우 넓은 범위의 세포적 진행과정에 관련한다. 본 시험을 통해 MAPK 14가 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다.

간세포 핵 인자(Hepatocyte nuclear factor) 4, 알파 (HNF4A): HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)는 간, 소화관, 신장 및 간 발생에 중요한 췌장 베타 세포에 주로 발현되는 핵 수용체 단백질이다. 인간에서는 HNF4는 2개의 이형질체가 있는데, HNF4A는 알파 이형질체를, HNF4G는 감마 이형질체를 각각 암호화하고 있다 (예를 들면 Chartier FL, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC, Laine B (1994). "Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver". Gene 147 (2): 269-72 참조).

HNF4는 원래 희귀 수용체로 분류되었었다. 하지만 이후에 HNF4가 다양한 지방산에 지속적으로 붙어있는 것 때문에 지속적으로 활성화 된다고 밝혀졌다 (예를 들면 Sladek F (2002). "Desperately seeking...something". Mol Cell 10 (2): 219-221 and Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005). "Fatty acid regulation of hepatic gene trnascription". J Nutr 135 (11) 참조). 다른 핵 수용체와 같이 HNF4의 리간드 결합역은 기본적인 알파 나선형의 샌드위치 폴드를 가지고 있으며 (예를 들면 Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest AD Jr, Johnson R, Spitzer T, Sefler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP (2002). "Hepatocyte nuclear factor 4 is a trnascription factor that constitutively binds fatty acids". Structure 10 (9): 1225-34 and Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE (2002). "Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand". J Biol Chem 277 (41): 37973-6 참조), 공활성단백질과 상호작용을 한다 (예를 들면 Duda K, Chi YI, Shoelson SE (2004). "Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding". J Biol Chem 279 (22): 23311-6 참조).

HNF4 알파 유전자의 변이는 소아성인형당뇨병 (MODY)과 관련되어 있다 (예를 들면 Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001). "Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young". N Engl J Med 345 (13): 971-80 참조)

HNF4 (Hepatocyte nuclear factor 4)는 간세포와 췌장세포에서 발현되는 많은 유전자를 조절하는 것으로 알려진 조직 특이적인 전사 인자 (trnascription factor)이다. 비록 HNF4가 신장의 일부분에서 매우 많이 발현되지만 신장에서의 역할이나 신장세포에서 발현되는 HNF4의 조절을 받는 유전자에 대해서는 많이 알려진 바가 없다. 신장암 (RCC)에서는 HNF4의 존재량과 활성이 자주 감소되고 이는 신장세포에서 HNF4가 발암 억제 기능을 하는 것을 의미한다. 흥미롭게도 HNF4의 조절을 받는 많은 유전자들은 신장암 마이크로어레이(microarray) 연구에서 규

제해지(deregulation)되는 것으로 알려졌다. 이러한 유전자들 (ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1, FLJ14146, CSPG2, TRIM9 및 HEY1)은 신장암에서 HNF4의 감소에 따라 활성이 변화되는 유전자 후보들이다.

[0451] HNF4알파(1M7W.pdb; Dhe-Paganon (2002) JBC, 277, 37973)의 리간드 결합 도메인의 구조에서 작은 지질이 관찰되었고 대장균(*E. coli*) 생산으로부터 함께 정제되었다. 결정체(crystal)는 단백질의 2가지 형태를 포함하고 있는데, 가늘고 긴 나선형10 (helix 10)과 짧은 나선형12 (helix 12)가 형태를 변화시킨다. 지질이 결합하는 부위를 살펴보면 흥미롭게도 2개의 출구지역(exits region)이 있는 것을 관찰할 수 있다. 하나의 출구지역은 작은 지질의 머리 그룹을 붙잡고 있으며 여러 개의 포켓지역(pocket region)들이 함께 위치하고 있음을 알 수 있다. Q10이 전사인자에 명확하게(specifically) 결합한다고 가정할 수 있다. 본 모델에서 Q10이 지질결합터널 (lipid binding tunnel)에 들어가면 Q10의 링부위가 표면의 포켓에 정확히 맞아 들어간다. (도면 28). 기존에 알려진 기능상실변이(loss-of-function) (E276Q)는 이러한 표면의 포켓의 안쪽 아미노산을 결정할 가능성이 있고 따라서 추측되는 Q10결합에 부정적인 영향을 미친다.

[0452] 더불어, Q10결합 모델에서 소수성(hydrophobic) 꼬리부분은 내부 구멍에서 뺄어나와 가늘고 긴 나선형10과 상호 작용한다. 따라서, 이러한 상호작용이 나선형10과 나선형12간의 형태변화를 일으킬 가능성도 있다. 이러한 현상은 전사인자의 활성의 활성/비활성 평형상태를 바꿀 수도 있다.

[0453] 실시예 7: 항체 마이크로어레이 분석

[0454] Q10이 존재함에 따른 단백질 농도의 분석은 항체 마이크로어레이 (microarray) 방법을 사용하여 평가하였다. 마이크로어레이는 다양한 단백질 종류와 가능한 작용기전 표지물(marker)로 구성된 700개 이상의 단백질에 대한 항체를 포함한다.

[0455] 첫 번째 시험은 Q10을 처리한 세포에서 단백질 농도의 변화를 측정하기 위해 항체 마이크로어레이 (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)와 Q10을 처리한지 6시간 혹은 24시간된 SK-MEL-28 세포를 이용하여 수행하였다. 세포를 거둬들인 후 수용성 단백질 상청액(supernatant)을 추출하여 얻었다. 각 샘플(1 mg/mL)로부터 얻은 단백질(약 총 1mg)은 두개로 나뉘어 각각 Cy3과 Cy5 형광염료(fluorescent dye)로 표시하였다. 과도한 염료는 단백질과 마이크로어레이 시험진행(incubation)에 사용된 물질로부터 제거시켰다. 두 개의 시간포인트에서 샘플을 비교하기 위해 서로 다른 표지가 된 샘플로부터 동일한 양의 단백질을 섞었다. (예: Cy3으로 표지된 3시간째 샘플을 Cy5로 표지된 24시간째 샘플과 섞었다.). 마이크로어레이 칩과 시험진행(incubation)한 후에 (제조사 추천 프로토콜에 따라), 칩을 씻고 말렸다. 형광 레이저 스캐너(scanner)를 사용하여 마이크로어레이를 스캔하여 Cy3 과 Cy5 표지의 상대적인 형광 강도를 측정하였다.

표 18

50 μM의 Q10을 사용한 24시간 치료 후 SK-MEL-28 세포에서 증가된

수준을 갖는 단백질

명칭	비율	명칭	비율
Cdk1	0.1	열 쇼크 단백질 110	0.4
DcR1	0.1	세린 트레오닌 단백질 포스파타제 1g1	0.4
단백질 키나제 Cb2	0.1	COX II	0.5
종양 괴사 인자 가용성 수용체 II	0.1	HSP70	0.5
BAD	0.1	BLK	0.5
카스파제13	0.2	시토크라틴 8 12	0.5
FBI1 PAKEMON	0.2	BUBR1	0.5
Zyxin	0.2	FOXC2	0.5
Cdc25A	0.3	세린 트레오닌 단백질 포스파타제 2 A Bg	0.5
PIASx	0.3	MSH6	0.5
신경 성장 인자 b	0.3	DR6	0.5
단백질 티로신 포스파타제 PEST	0.3	Rad17	0.5
hBRM hSNF2a	0.4	BAF57	0.5
GRP94	0.4	형질전환 성장 인자b pan	0.5
칼모듈린	0.4	BTK	0.5
세린 트레오닌 단백질 포스파타제 2C a b	0.4	세린 트레오닌 단백질 포스파타제 2 A/B pan2	0.5
ARC	0.4	CNPase	0.5
뉴라빈II	0.4	SynCAM	0.5
산화질소 신타제 bNOS	0.4	증식 세포 핵 항원	0.5
세린 트레오닌 단백질 포스파타제 1b	0.4		

[0456]

표 19

50 μM의 Q10을 사용한 24시간 치료 후 SK-MEL-28 세포에서 증가된

수준을 갖는 단백질

명칭	비율	명칭	비율
Bclxl	4.2	클라스핀	2.1
BID	3.7	GRP75	2.1
Bmf	3.7	카스파제 6	2.1
PUMA bbc3	3.0	ILP2	2.1
Zip 키나제	2.8	액티닌	2.1
Bmf	2.8	비트로넥틴	2.1
DcR2	2.7	DRAK1	2.1
E2F1	2.7	PTEN	2.1
FAK pTyr577	2.5	Grb2	2.1
FKHRL1 FOXO3a	2.5	HDAC4	2.0
MTBP	2.5	HDAC7	2.0
코넥신 32	2.5	산화질소 신타제 bNOS	2.0
어넥신 VII	2.4	HDAC2	2.0
P63	2.4	p38 MAPK	2.0
SUMO1	2.4	렐린	2.0
Iafadin	2.3	단백질 키나제 Cd	2.0
MDMX	2.3	cerbB3	2.0
Pyk2	2.3	hSNF5 INI1	2.0
RIP 수용체 상호작용 단백질	2.3	단백질 키나제 Ca	2.0
RICK	2.3	글루타메이트 수용체 NMDAR 2a	2.0
IKKa	2.3	렐틴	2.0
Bclx	2.3	디메틸 히스톤 H3 diMeLys4	2.0
Afadin	2.2	BID	2.0
증식 세포 단백질 Ki67	2.2	MeCP2	2.0
히스톤 H3 pSer28	2.2	신경 성장 인자 수용체 p75	2.0
CASK LIN2	2.2	미오신 경쇄 키나제	2.0
센트린	2.2	cRaf pSer621	2.0
TOM22	2.1	GRP78 BiP	2.0
산화질소 신타제 내피 eNOS	2.1	cMyc	2.0
단백질 키나제 Ba	2.1	Raf1	2.0
라미닌	2.1	MTA2 MTA1L	2.0
미오신 Ib 핵	2.1	Sir2	2.0
카스파제 7	2.1	ATF2 pThr69 71	2.0
MAP 키나제 2 ERK2	2.1	단백질 키나제 C	2.0
KIF17	2.1	단백질 키나제 Cb2	2.0

[0457]

[0458]

사전에 관찰된 세포사멸 단백질을 확인함과 동시에 더 많은 수의 세포사멸을 촉진하는 단백질과 세포사멸을 억제하는 단백질을 알아보기 위하여 잠재적으로 관련될 수 있는 넓은 범위의 단백질군을 검진할 수 있는 2가지 분석방법을 선택하였다.

[0459]

첫 번째로, 항체 마이크로어레이 (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)를 이용하여 50 μM Q10을 24시간 동안 처리한 SK-MEL-28 세포에서 단백질 농도 수준이 변화하는 것을 평가하기 위해 700개가 넘는 단백질 항체를 검진하였다.

[0460]

Q10을 24시간 처리한 SK-MEL-28 세포에 대한 항체어레이 시험으로부터 발현수준이 변경된 단백질을 다음과 같이 찾아내었다: Bcl-x1, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Connexin 32, PμMA bbc3, BID, Par4, cCbl. 금번 초기 시험을 통해 예상된 세포사멸을 촉진하는 단백질이 변경된다는 중요한 사실을 알 수 있었다.

[0461]

SK-MEL-28 세포에 대한 항체 마이크로어레이

[0462]

항체 마이크로어레이 (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)를 이용하여 50 μM Q10을 24시간 동안 처리한 SK-MEL-28 세포에서 단백질 농도 수준이 변화하는 것을 평가하기 위해 700개가 넘는 단백질 항체를 검진하였다.

표 20

50 μM Q10으로 처리한 SKMEL-28에서 단백질 수준의 변화

명칭	항체 번호 (Sigma)	SKMEL28 Q10/ SKMEL28 대조군	SKMEL28/ HEKa 대조군	HEKa Q10/ HEKa 대조군
BclxL	B9429	2.46	1.04	1.83
PUMA bbc3	P4743	2.31	1.14	2.14
Bmf	B1559	2.23	1.12	2.11
Bmf	B1684	2.09	1.13	1.74
cJun pSer63	J2128	1.99	1.14	1.85
BLK	B8928	1.94	1.05	1.51

[0463]

[0464]

Q10을 24시간 처리한 SK-MEL-28 세포에 대한 항체어레이 시험으로부터 발현수준이 변경된 단백질을 다음과 같이 찾아내었다: Bcl-x1, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Connexin 32, PUMA bbc3, BID, Par4, cCbl. 외부에서 Q10을 추가하여 증가된 수준에서 세포사멸을 촉진하는 단백질의 수준이 변경된 것을 확인하였다.

[0465]

Bcl-x1 ("Basal cell lymphoma-extra large")는 미토콘드리아의 막을 통과하는 분자이다. FAS-L의 신호전달 기전에 관련되어 있으며 Bcl-2단백질군 중 세포사멸을 억제하는 여러 단백질 중 하나이다. 이것은 암세포의 생존에 관련된 것으로 알려져 있다. 하지만 인간 Bcl-x mRNA의 선택적 이어맞추기(alternative splicing) 과정에 의해 최소 2개의 서로 다른 Bcl-x mRNA 종류 (Bcl-xL과 Bcl-xS)로 나타나는 것으로 알려져 있다. 주된 단백질 (233개 아미노산)은 성장인자가 없어짐에 따라 세포가 사멸하는 것을 억제하는 더 큰 Bcl-x mRNA에서 생성된 Bcl-xL 단백질이다(Boise et al., 1993 . Cell 74, 597-608). 반면에 Bcl-xS는 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 역할을 억제하고 세포가 보다 세포사멸을 허용할 수 있도록 만들어 준다.

표 21

100 μM의 Q10으로 치료한지 24시간 후 SCC 세포에서 증가된 수준을 갖는 단백질

명칭	비율	명칭	비율
PUMA bbc3	3.81	Sir2	2.25
HDAC7	3.21	DcR3	2.24
BID	3.12	RbAp48 RbAp46	2.21
MTBP	3.00	OGlcNAc 트랜스퍼라제	2.21
비활성화된 p38 MAP 키나제	2.93	GRP78 BiP	2.20
PKR	2.87	Sin3A	2.20
TRAIL	2.86	p63	2.20
DR5	2.86	프레세닐린1	2.19
Cdk3	2.82	PML	2.18
NC어드헤린 렐린	2.71	PAK1pThr212	2.17
p35 Cdk5 조접인자	2.68	HDAC8	2.16
HDAC10	2.60	HDAC6	2.15
RAP1	2.59	산화질소 신타제 유도성 iNOS	2.15
PSF	2.56	신경피브로민	2.15
cMyc	2.55	신타신 6	2.13
메틸 히스톤 H3 MeLys9	2.54	Parkin	2.12
HDAC1	2.51	Rad17	2.11
F1A	2.48	산화질소 신타제 bNOS	2.10
ROCK1	2.45	TIS7	2.09
Bim	2.45	OP18 스타트민 (스타트민 1/중양단백질 18)	2.08
FXR2	2.44	포스포 -β-카테닌 pSer45	2.07
DEDAF	2.44	뉴라빈II	2.07
DcR1	2.40	e 튜블린	2.07
APRIL	2.40	PKB pThr308	2.07
PRMT1	2.36	오르니틴 데카복실라제	2.07
Pvk2 pTyr580	2.34	P53 BP1	2.06
비트로넥틴	2.33	Pvk2	2.05
시냅토포딘	2.32	HDAC5	2.05
카스파제13	2.30	코넥신 43	2.05
신타신 8	2.29	a1신타로핀	2.04
DR6	2.29	MRP1	2.04
BLK	2.28	cerbB4	2.03
ROCK2	2.28	S 니트로소시스테인	2.03
		SGK	2.02
		Rab5	2.01
		유비퀴이틴 C 말단 하이드롤라제 L1	2.01
		미오신 Ib 핵	2.00
		Par4 전립선 아포토시스 반응 4	2.00

[0466]

표 22

100 μM의 Q10으로 치료한지 24시간 후 SCC세포에서 감소된 수준을 갖는 단백질.

명칭	비율
AP1	0.68
센트린	0.55
CUGBP1	0.67
시스타틴 A	0.69
세포 케라틴 CK5	0.60
피브로넥틴	0.63
α파르빈	0.70
성장 인자 독립1	0.63
신경 성장 인자 b	0.60
프로 카스파제 8	0.72
Rab7	0.62
Rab9	0.73
세린 트레오닌 단백질 포스파타제 1g1	0.71
세린 트레오닌 단백질 포스파타제 2 A	0.73
Bg	
SKM1	0.70
SLIPR MAG13	0.67
스펙트린 a 및 b	0.70
스프레드2	0.66
TRF1	0.74

[0467]

[0468]

실시예 8: 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석

[0469]

첫 번째 실험은 피부 암세포주 SKMEL-28을 이용하여 웨스턴 블롯과 2-D 겔 전기영동을 수행하였다. 50 μM 혹은 100 μM Q10을 각 3, 6, 12 및 24시간째 SK-MEL-28 세포에 처리하였다.

[0470]

Bcl-xL에 대한 항체(도면 14), Vimentin에 대한 항체(도면 15), 미토콘드리아 산화성 인산화반응 기능에 대한 다양한 항체들(도면 16-21) 및 미토콘드리아 막의 온전함(integrity)에 대한 다양한 항체들(도면 22-27)을 사용하여 다양한 세포 종류에 대해 평가하였다. 본 실험 결과 Q10 처리에 따라 여러 단백질들의 수준이 증가되거나 감소되었다.

[0471]

실시예 9: 100 μM Q10을 처리한 췌장암 세포(PaCa2)에서 mRNA 수준이 조절되는 당뇨병 관련 유전자 발견

[0472]

100 μM Q10을 처리한 후 다양한 시간대별로 준비한 샘플을 당뇨병 어레이를 사용하여 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 위에서 언급된 방법으로 수행되었다. Q10처리에 따라 조절되는 다양한 유전자를 아래 표 23에 정리하였다. 그 결과 ABCC8, ACLY, ADRB3, CCL5, CEACAM1, CEBRA, FOXG1, FOXP3, G6PD, GLP1R, GPD1, HNF4A, ICAM1, IGFBP5, INPPL1, IRS2, MAPK14, ME1, NFKB1, PARP1, PIK3C2B, PIK3CD, PPARGC1B, PRKAG2, PTPN1, PYGL, SLC2A4, SNAP25, HNF1B, TNFRSF1A, TRIB3, VAPA, VEGFA, IL4R 및 IL6과 같은 유전자들이 Q10처리에 따라 조절되었다.

표 23

발현이 100 μM Q10으로 조절된 당뇨병 어레이로부터의 유전자 및 세포에서 이들의

가능한 기능. 상향 조절된(회색) 및 하향 조절된 (백색)

유전자 명칭	유전자 기능
ADRB	cAMP 시그널 전달, G-단백질 시그널 전달
CCL5	CCR5에 대한 및 TNF에 의해 조절되는 천연 리간드
CEACAM1	항아포토시스, 혈관형성의 양성 조절
GLPR1	채장으로부터 인슐린을 증가시키고 채장으로부터 글루카곤 분비를 감소시킨다
GPD1	탄수화물 대사, NADH 산화
ICAM1	아도르바스타틴에 의해 조절됨, 카스파제를 프로세싱,
MAPK14	DNA 손상 체크포인트, 혈관형성, 글루코스 대사 과정
PARP1	DNA 복구, TP53, NOS2A, NFkB, 텔로미어 유지를조절함
PIK3C2B	포스포이노시티드 매개된 시그널 전달, AKT 및 AKT1을 조절함.
PIK3CD	키나제
PYGL	탄수화물 대사, 글리코겐 및 글리코겐 신타제를 조절함
SLC2A4	글루코스를 조절하고 INS 및 인슐린에 의해 조절됨.
SNAP25	인슐린 분비, 신경전달인자 흡수의조절.
CEBPA	글루코코르티코이드 수용체 시그널 전달, VDR/RXR 활성화
FOXP3	IL4, IL2를 조절한다.
G6PD	헵토스 포스페이트 경로, 글루타티온 대사
IGFBP5	IGF1에 의해 조절되는 세포 증식의 조절
INPPL1	Akt 및글리코제를조절함
IRS2	IGF-1 시그널 전달
ME1	말산을 조절하고 T3에 의해 조절됨.
NFKB1	IL6 및 TNF를 조절함.
PPARGC1B	MAPK14에 의해 조절됨
PRKAG2	지방산, 콜레스테롤 생 합성.
PTPN1	JAK2 및 EGF수용체 키나제를 탈인산화시킨다.
VEGFA	키나제, 혈관형성
IL4R	TP73에 의한 상향조절, IRS1 및 IRS2에 결합시킴
HNF1B	HNF4A
TNFRSF1A	프로-아포토시스
TRIB3	AKT1 및 NFkB 의 음성 조절인자를 조절함
VAPA	NFkB, 소포트래픽킹을 조절함

[0473]

[0474]

[0475]

실시에 10: 100 μM Q10을 처리한 채장암 세포(PaCa2)에서 mRNA 수준이 조절되는 신생혈관생성 관련 유전자 발견

100 μM Q10을 처리한 후 다양한 시간대별로 준비한 샘플을 신생혈관생성 어레이를 사용하여 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 위에서 언급된 방법으로 수행되었다. Q10처리에 따라 조절되는 다양한 유전자를 아래 표 24에 정리하였다. 그 결과 AKT1, ANGPTL4, ANGPEP, CCL2, CDH4, CXCL1, EDG1, EFNA3, EFNB2, EGF, FGF1, ID3, IL1B, IL8, KDR, NRP1, PECAM1, PROK2, SERPINF1, SPHK1, STAB1, TGFB1, VEGFA 및 VEGFB 과 같은 유전자들이 Q10처리에 따라 조절되었다.



표 24

100 μM Q10 으로 발현이 조절되는 혈관형성 어레이 기원의 유전자목록 및 이들의 세포에서의 가능한 기능 . 상향 조절됨 (회색) 및 하향 조절 (백색)

유전자	유전자 기능
ANGPTL4	항혈관형성, 아포토시스의 음성 조절인자, 지질 대사.
CDH5	혈관 성숙, 세포 접착, 세포 증식의 음성 조절인자
FGF1	세포 접착, 세포 증식.
AKT1	탄수화물 대사 과정, 글리코겐 생합성 과정, 글루코스 대사 과정, 인슐린 수용체 시그널 전달 경로, 프로-아포토시스 유전자 생성물의 활성화, 아포토시스 미토콘드리아 변화
ANPEP	단백질분해, 다세포 기관 발달, 세포 분화
CCL2	케모택시스, 항 -아포토시스, JAK-STAT 캐스케이드, 기관 형태발생, 바이러스 게놈 복제
CXCL1	케모택시스, 염증 반응, 면역반응, 세포 증식의 음성 조절, 액틴 세포 골격 구조화 및 생물발생
EDG1	세포 증식의 양성 조절, 신경 임펄스의 전달, 세포 접착의 조절, 신경 분화, 세포 이동의 양성 조절, Ras의 양성 조절
EFNB2	세포-세포 시그널 전달, VEGFA에 의해 조절됨.
EGF	MAPKK 활성의 활성화, 유사분열의 양성 조절, DNA 복제
IL1B	글루코코르티코이드 자극에 대한 응답, 아포토시스, 시그널 전달, 세포-세포 시그널 전달, 세포 증식의 음성 조절
IL8	세포 주기 정지
KDR	VEGF 경로, AKT에 의해 조절됨.
NRP1	세포 접착, 시그널 전달, 세포-세포 시그널 전달, 세포 증식, VEGFA에 의해 조절됨
PECAM1	세포 접착, TNF에 의해 조절됨.
PROK2	MAPK의 활성화, 항 -아포토시스, 세포 증식, AKT를 조절한다.
SPHK1	항 아포토시스, 세포 증식, 유사분열을 조절함, 세포 이동
STAB1	염증 반응, 세포 접착, 수용체-매개 세포내이입, 세포-세포 시그널 전달, 혈관형성의 음성 조절, 세균에 대한 방어 반응
VEGFA	항 아포토시스, TNF를 조절함, HIF1에 의해 조절됨.

[0476]

[0477] 실시예 11: 100 μM Q10을 처리한 췌장암 세포(PaCa2)에서 mRNA 수준이 조절되는 세포사멸 관련 유전자 발견

[0478] 100 μM Q10을 처리한 후 다양한 시간대별로 준비한 샘플을 세포사멸 어레이를 사용하여 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 위에서 언급된 방법으로 수행되었다. Q10처리에 따라 조절되는 다양한 유전자를 아래 표 25에 정리하였다. 그 결과 ABL1, AKT1, Bcl2L1, Bcl1AF1, CASP1, CASP2, CASP6, CIDEA, FADD, LTA, TNF, TNFSF10A 및 TNFSF10 과 같은 유전자들이 Q10처리에 따라 조절되었다.

표 25

100 μM Q10 으로 발현이 조절되는 아포토시스 어레이 기원의 유전자목록 및 이들  
의 세포에서의 가능한 기능 . 상향 조절됨 (회색) 및하향 조절 (백색)

유전자	유전자 기능
CASP1	프로-아포토시스, IL1B을 조절, TNF에 의해조절됨.
CASP6	프로-아포토시스, PARP를 조절, MCL1, APP
TNF	세포 증식, 분화, 아포토시스, 지질 대사, 및 응고
TNFSF10	프로-아포토시스, 카스파제를조절함.
ABL1	Bcl2L1을 조절함, TP53, 프로-아포토시스, 액틴 세포 골격 조절 및 생물발생
AKT1	프로-아포토시스 아포토시스성 미토콘드리아 변화, 탄수화물 수송체, 열, 글루코스 대사, IGF 시그널 전달 경로에 대한 응답.
BclAF1	프로-아포토시스.
Bcl2L1	항아포토시스, 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 방출, 카스파제를 조절함, BAD, BAX, Bcl2L1에 결합함
CASP2	항아포토시스.
CIDEA	프로-아포토시스
FADD	프로-아포토시스
LTA	프로-아포토시스
TNFSF10A	카스파제 활성화인자

[0479]

[0480]

실시예 12: 간세포(HEPG2)에 대한 PCR 당뇨병 어레이

[0481]

HepG2(간암세포)세포에 비히클(vehicle)를 24시간 처리하거나 혹은 100 μM Q10을 각기 다른 시간동안 처리하였다. 각 웰(well)당 처음에는 1x10<sup>5</sup>의 세포를 처리하였고 이후에 PaCa2세포에 사용하였던 절차를 따랐다. (상기 실시예 9-11). 하지만 예상보다 이 샘플에서 추출한 RNA의 총 양은 적었다. 전체 RNA의 1 μg을 사용하여 역전사 시험(reverse transcription)을 수행하였다 (260nm에서 측정하여 정량함). 역전사시험에 사용한 최대 용량은 8ul이다. RNA 농도가 낮기 때문에 매개체를 이용하거나 Q10을 처리하고 16시간과 48시간이 지난 샘플을 이용한 RT-PCR 어레이는 0.44 μg의 RNA를 이용하여 수행하였다. 아래 표 26에 정리된 것과 같이, Q10 100 μM을 처리하였을 때 HepG2세포 유전자의 조절에 대한 트렌드와 패턴에 대한 초기 분석결과를 어레이를 통해 얻었다. 결과에 따르면, PPARGC1A, PRKAA1 및 SNAP25 유전자가 처리후 16시간째 발현이 감소되었다 (대조군 대비, 각각 약 20배, 6배 및 5배 감소). 처리후 48시간째에는 PPARGC1A 와 PRKAA1 유전자는 발현이 정상으로 돌아오거나 혹은 약간 증가되었으나 SNAP25 유전자는 약 2배 정도 발현이 감소되었다.

표 26

HepG2 세포가 100 μM Q10로 치료되는 경우 당뇨병 어레이에서 조절되는 유전자 목록

유전자	유전자 명칭	유전자 기능
PPARGC1A	피옥시좀 증식인자 활성화된 수용체 감마, 동시 활성화인자 1 알파	세포 사멸, 증식, 세포 호흡 및 막 관통 전위에 관여함
PRKAA1	단백질 키나제, AMP-활성화된, 알파 1 촉매 서브 유닛	TP53을 조절하고 아포토시스에 관여하고, 해당과정을 조절하고 대사적 효소 활성을 조절함.
SNAP25	시냅토조멸 관련 단백질, 25kDa	수송체, 융합, 엑소사이토시스에서의 역할 및 분자의방출.

[0482]

[0483]

[0484] 실시예 13: 간세포에 대한 PCR 신생혈관형성 어레이

[0485] HepG2(간암세포)세포에 비히클(vehicle)를 24시간 처리하거나 혹은 100  $\mu$ M Q10을 각기 다른 시간동안 처리하였다. 각 웰(well)당 처음에는  $1 \times 10^5$ 의 세포를 처리하였고 이후에 PaCa2세포에 사용하였던 절차를 따랐다. (상기 실시예 9-11). 하지만 예상보다 이 샘플에서 추출한 RNA의 총 양은 적었다. 전체 RNA의 1  $\mu$ g을 사용하여 역전사 시험(reverse trnascription)을 수행하였다 (260nm에서 측정하여 정량함). 역전사시험에 사용한 최대 용량은 8  $\mu$ l이다. RNA 농도가 낮기 때문에 매개체를 이용하거나 Q10을 처리하고 16시간과 48시간이 지난 샘플을 이용한 RT-PCR 어레이는 0.44  $\mu$ g의 RNA를 이용하여 수행하였다. 아래 표 27에 정리된 것과 같이, Q10 100  $\mu$ M을 처리하였을 때 HepG2세포 유전자의 조절에 대한 트렌드와 패턴에 대한 초기 분석결과를 어레이를 통해 얻었다. Q10 처리에 따른 다양한 유전자가 조절되는 결과를 표 27에 정리하였다. 결과에 따르면, ANGPTL3, ANGPTL4, CXCL1, CXCL3, CXCL5, ENG, MMP2 및 TIMP3 유전자가 처리후 16시간째 발현이 증가되었다 (대조군 대비, 각각 약 5.5배, 3배, 3배, 3.2배, 3배, 3배, 1배 및 6.5배, 6배 및 5배 증가). ID3유전자는 Q10 처리후 16시간째 대조군 대비 약 5배 정도 발현이 감소되었다. 처리후 48시간째에는 ANGPTL3, CXCL1, CXCL3, ENG 및 TIMP3 유전자는 여전히 발현이 증가된 반면 (대조군 대비, 각각 약 3.5배, 1.5배, 3.175배, 2배 및 3배), ANGPTL4, CXCL5, ID3 및 MMP2 유전자는 대조군 대비 각각 약 1배, 1배, 2배 및 18배 발현이 감소되었다.

표 27

HepG2 세포가 100 μM Q10로 치료되는 경우 혈관형성 어레이에서 조절되는 유전자

목록

유전자	유전자 명칭	유전자 기능
ANGPTL3	안지오포이에틴 3형	주로 간에서 발현되고, 세포 이동 및 접착에서 역할하고 지질 및 글루코스 대사 및 인슐린 민감성에서 작용함
ANGPTL4	안지오포이에틴 4형	PPARG에 의해 조절됨, 세포 내피 세포에 대한 아포토시스 억제제, 지질 및 글루코스 대사 및 인슐린 민감성에서 작용함
CXCL1	케모킨 (C-X-C motif) 리간드 1 (막 성장 자극 활성, 알파)	세포 증식 및 이동에서 역할함
CXCL3	케모킨 (C-X-C motif) 리간드 3	케모킨 활성화, 간 스텔라 세포 활성화, 이동, 증식.
CXCL5	케모킨 (C-X-C motif) 리간드 5	IL1 또는 TNFA로 자극되는 경우 IL8과 함께 생성됨. 케모택시스, 이동 및 증식에 작용함
ENG	엔도글린	TGFBR에 결합하고 이동, 증식, 접착 및 침입에 관여함
ID3	DNA 결합 3의억제제, 주요 음성 나선-루프-나선 단백질	MMP2를 조절함, TGFBI, 비타민 D3, 레티노산, VEGFA에 의해 조절되고, 아포토시스, 증식, 분화, 이동에 관여함.
MMP2	매트릭스 메탈로 펩티다제 2 (겔라티나제 A, 72kDa 겔라티나제, 72kDa IV 형 콜라겐아제)	간 스텔라 세포 활성화, HIF 시그널 전달, TIMP3에 결합함, 종양발생, 아포토시스, 증식, 침입, 이동 및 케모택시스에 관여함
TIMP3	TIMP 메탈로 펩티다제 억제제 3	MMP2, ICAM1을 조절함. TGFBI, EGF, TNF, FGF 및 TP53에 의해 조절됨. 아포토시스, 세포-세포 접착 및 악성종양에 관여함

[0486]

[0487]

RT-PCR 어레이는 신생혈관형성 과정에 관련된 것으로 알려진 단백질로 구성되어 있다. 신생혈관형성은 암세포가 악성으로 변화하는 과정에서 매우 중요한 것이다. 이 중 몇몇 단백질은 당뇨병에도 관련되어 있다.

[0488]

ANGPTL3 및 ANGPTL4: 관련 논문에 따르면, ANGPTL3은 이 단백질이 지질대사 조절에 관련되어 있다고 알려져 있다. 특히 한 논문(Li, C. Curr Opin Lipidol. 2006 Apr;17(2):152-6)은 신생혈관형성 촉진 성장인자(angiopoietins)와 유사 신생혈관형성 촉진 성장인자(angiopoietins-like)가 유사한 도메인 구조를 가지고 있다고 밝히고 있다. ANGPTL3과 4는 지방단백질(lipoprotein)을 활성을 억제하는 상과(上科, superfamily)에 속하는 유일한 두 개의 단백질이다. 하지만, ANGPTL3과 4는 각기 다른 수준에서 조절되며 생체 내에서 각기 다른 역할(non-redundant function)을 하는 것으로 알려져 있다. ANGPTL3과 4는 단백질분해되어 2개로 분해되고 핵 수용체에 의해 각기 다르게 조절된다. ANGPTL4를 과발현시킨 트랜스제닉(trnsgenic) 모델과 ANGPTL3과 4를 녹아웃(knock-out) 시킨 모델에서 이 두 개의 단백질이 지방단백질 대사에 필수적인 역할을 하는 것을 밝혔다. 간세포 유래 ANGPTL3은 음식을 먹은 상태에서의 지방단백질 지방가수분해효소(리파아제, lipase)의 활성을 주로 억제하는 반면에, ANGPTL4는 음식을 먹은 상태와 먹지않은 상태 모두에서 중요한 역할을 한다. 추가적으로, ANGPTL4는 지방단백질 유래 지방산의 조직 특이적인 이동을 조절한다. 따라서 ANGPTL4는 발현되는 장소에 따라 지방단백질 지방가수분해효소를 내분비적(endocrine)이나 자가분비적(autocrine)/근거리분비적(paracrine)으로 억제한다.

- [0489] 지방단백질 지방가수분해효소는 킬로미크론(chylomicrons)과 저밀도지단백(low-density lipoprotein, VLDL)에서 발견되는데, 지방단백질의 지질을 3개의 유리지방산(free fatty acide)과 1개의 글리세롤(glycerol) 분자로 가수분해하는 효소이다. 해당 조직에서 지방단백질 지방가수분해효소의 활성은 트리글리세리드(triglyceride)유래 지방산을 흡수하는데 반응속도를 제어하는 요소이다. 지방산의 분배의 불균형은 중요한 물질대사의 결과를 초래한다. 고지방 음식섭취는 조직특이적인 인슐린저항성과 이에 따른 제2형 당뇨병 발달에 연루된 조직특이적인 LPL의 과발현을 일으킨다.
- [0490] 본 실시예의 결과들은 Q10이 지질 대사에 관련된 단백질을 조절하며 ANGPTL3/ANGPTL4 유전자와 이와 관련된 기전에 대해 추가적인 연구가 필요함을 의미한다. 예를 들어, ANGPTL3/ANGPTL4는 Akt, 콜레스테롤, 지방산, HDL-콜레스테롤, HNF1A, ITGA5, ITGA5, ITGAV, ITG83, L-트릴라이오도티노닌(trilodothyronine), LIPG, LPL, Mapk, Nrth, NR1H3, PPARD, PTK2, RXRA, 트리아실글리세롤 및 9-시스-레티노산 같은 경로에 관련되어 있다고 알려져 있다.
- [0491] 실시예 14: 간세포(HEPG2)에 대한 PCR 세포사멸 어레이
- [0492] 상기 기술된 것처럼 100 μM Q10을 처리하고 16시간과 48시간이 지난 샘플을 이용하여 세포사멸 어레이를 수행하였다. 하지만 48시간을 위한 어레이는 형광단(fluorophore)을 SYBR대신 FAM을 사용하였다. FAM과 SYBR은 동일한 과정에서 형광 빛을 낸다.
- [0493] Q10처리에 따른 다양한 유전자가 조절되는 결과를 표 28에 정리하였다. Q10처리 후 16시간째 CASP9유전자는 대조군 대비 약 61배 정도 발현이 증가되었으며, BAG1과 TNFRSF1A는 처리 후 16시간째 대조군 대비 각각 약 6배와 4배 정도 발현이 감소되었다. 처리 후 48시간째에는 CASP9, BAG1 및 TNFRSF1A는 대조군 대비 각각 약 55배, 1배 및 1배씩 발현이 증가되었다.

**표 28**

HepG2 세포가 100 μM Q10로 치료되는 경우 아폽토시스 어레이에서 조절되는 유전자 목록

유전자	유전자 명칭	유전자 기능.
BAG1	BCL2-연합 아타노유전자	아폽토시스에 관여함
CASP9	카스파제 9, 아폽토시스 관련 시스테인 펩티다제	시토크롬 c의 방출을 통한 아폽토시스.
TNFRSF1A	중양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 1A	항-아폽토시스, 많은 세포 사멸 인자에 결합함. ICAMI을 조절함

- [0494]
- [0495] 실시예 15: MIM 혹은 epi-변환인자의 종양학적 질병을 치료할 수 있는 능력 평가
- [0496] 선택된 MIM 혹은 epi-변환인자, 즉 CoQ10이 흑색종(melanoma)과 같은 종양학적 질병을 치료할 수 있는 능력이 있는지 쥐(murine) 모델을 사용하여 평가하였다. SK-MEK28을 피하층에 주사하여 흑색종 종양을 유도하였다. 동물실험은 각각 대조군과 시험군에 4마리의 생쥐들(mice)을 사용하여 진행하였다. 생쥐들은 2개의 종양을 가질 수 있도록 접종하였다. MIM 혹은 epi-변환인자의 국부적 체형을 30일간 매일 시험군에 처리하였으며 그 이후에 종양을 절제하여 무게를 측정하였다. 대조군에 비교하여 시험군의 총체적 평균 무게에서 유의한 차이가 보임에 따라 MIM 혹은 epi-변환인자가 종양을 치료하는데 효과적이라고 밝혀졌다.
- [0497] 실시예 16: 종양학적 질병과 관련된 MIM의 식별
- [0498] 가능한 MIM으로서 후보물질 (예를 들어 환경적 영향인자)을 평가하기 위하여 질병 세포주 (암세포)와 정상 세포주를 포함하는 세포주 패널(panel)에 선택된 후보 MIM을 외적으로 첨가하였고, 각 패널의 각 세포주에 대한 세포성 미세환경적 프로파일을 유도하는 변화를 평가하였다. 세포의 형태학적, 생리학적 및 mRNA와 단백질 수준과 같은 세포 구성물에 대한 변화를 측정하였고 정상 세포주와 질병 세포주를 비교하였다.
- [0499] 후보 MIM에 대한 세포의 민감도(sensitivity)와 세포사멸적 반응을 측정함으로써 세포의 형태학적 및 생리학적 변화를 평가하였다. 본 시험은 예 3에서 기술된 방법으로 수행되었다. 간략히 설명하면, 최소 1개의 대조군 세

포주와 최소 1개의 암세포 세포주로 구성된 세포주 패널에 후보 MIM을 다양한 농도로 처리하였다. 가능한 MIM에 대한 세포주의 민감도는 여러 농도 범위에 걸쳐 여러 시간대별로 세포의 생존을 관찰하여 측정하였다. 가능한 MIM에 대한 세포주의 세포사멸 반응은 예를 들어 Nexin물질과 유세포분석기 (flow cytometry) 방법을 결합한 방법을 사용하여 측정하였다. Nexin물질은 2개의 염색제와 7AAD 및 Annexin-V-PE로 구성되어 있으며 세포사멸의 초기와 말기에서 세포의 수를 정량할 수 있다. 또 다른 세포사멸 측정방법은 APOSTRNADTM ELISA 방법을 통해 단일가닥(single-stranded) DNA를 측정하는 방법도 있다. 질병 세포주와 대조군 세포주의 민감도와 세포사멸성 반응도를 측정하고 비교하였다. 정상 세포에 비교해 질병 세포에서 차별된 세포독성이나 세포사멸적 반응을 유도하는 물질은 MIM으로 식별하였다.

[0500] 후보 MIM을 처리한 후에 세포의 구성물질에 변화를 측정하였다. 실시간 PCR 어레이 방법을 통해 mRNA 수준의 유전자 발현 변화를 분석하였다. 이 실험은 상기 실시예 6과 실시예 9-13에서 설명된 방법으로 수행되었다. 간략히 설명하면, 후보 MIM을 정상 대조군 세포주와 질병 세포주의 한 개 이상의 세포에 외적으로 추가하였고 처리 후 다양한 시간 대에서 mRNA를 세포로부터 추출하였다. 특정 기전에 관련된 유전자의 mRNA 발현 수준은 세포사멸, 산화적 스트레스, 항산화 방어, 신생혈관생성, 열충격(heat shock) 혹은 당뇨병에 대한 어레이등을 포함하는 표적기전 (targeted pathway) 어레이를 이용하여 평가되었다. mRNA 전사수준이 2배 이상 변화된 유전자를 선별하여 분석하였다. 세포내 mRNA 수준의 변화를 유도하거나 정상 세포에 비해 질병 세포에서 한 개 이상의 mRNA 수준의 차별적 변화를 유도하는 물질을 MIM으로 식별하였다.

[0501] 보완적 실험에서, 항체 마이크로어레이 방법과 2-D 겔 전기영동법을 사용하여 단백질 수준의 유전자 발현 변화를 분석하였고 질량분석법을 이용한 단백질 식별과 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 이러한 실험들은 예 7, 4 및 8에서 각기 설명된 방법처럼 수행되었다. 간략히 설명하면, 후보 MIM을 정상 대조군 세포주와 질병 세포주의 한 개 이상의 세포에 외적으로 추가하였고 처리 후 6시간째 혹은 24시간째와 같이 다양한 시간 대에서 용해성 단백질을 세포로부터 추출하였다. 다양한 범위의 단백질 종류와 가능한 기전 마커와 같은 700여개 이상의 단백질에 대한 항체를 포함하고 있는 항체어레이를 사용하여 후보 MIM에 의한 단백질의 수준변화를 평가하였다. 더 나아가 상호보완적인 단백질체학(proteomic) 분석을 2-D 겔 전기영동과 질량분석법을 이용하여 수행하였다. 후보 MIM을 정상 대조군 세포주와 질병 세포주의 한 개 이상의 세포에 외적으로 추가하였고 세포 덩어리를 용해하여 2-D 겔 전기영동에 사용하였다. 처리되지 않은 샘플인 대조군에 비해 처리받은 샘플에서 단백질 수준변화를 식별하기 위해 겔을 분석하였다. 증가 혹은 감소된 수준 혹은 단백질변역 후 변역(post-translational modification)에 따른 처리시간에 따른 점의 변화를 식별하기 위해 겔을 분석하였다. 통계적으로 유의한 변화를 보이는 점을 절제하여 트립신을 사용해 분해하고 질량분석법을 통해 단백질을 식별하였다. 식별된 펩타이드를 단백질을 찾는 Mascot와 MSSTAT 소프트웨어 분석과 같은 단백질 데이터베이스를 통해 검색하였다. 앞선 2-D 겔 전기영동과 항체 마이크로어레이 실험에 추가해서 후보 MIM에 의해 유도된 특정 단백질의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 평가하였다. 이러한 모든 단백질체학 실험에서 다양한 세포주에서 발현이 증가되거나 감소되는 단백질을 식별하고 평가하였다. 세포내 단백질 수준의 변화를 유도하거나 정상 세포에 비해 질병 세포에서 한 개 이상의 단백질 수준의 차별적 변화를 유도하는 물질을 MIM으로 식별하였다.

[0502] 앞선 실험에서 후보 MIM 처리에 의해 조절되는 유전자를 세포적 그리고 생화학적 기전을 통해 분석하였고 이들은 세포사멸, 암, 세포성장, 해당과정 및 대사, 분자적 이동 그리고 세포신호 등과 같은 다양한 세포적 기전으로 분류되었다.

[0503] 후보 MIM이 세포내로 들어가는 것을 확인하고 세포내에서 국소적으로 위치하는지를 밝히고 세포내에 존재하는 수준과 형태를 밝히기 위해 실험을 수행하였다. 본 실험은 예 5에서 기술된 방법으로 진행하였다. 예를 들어, 미토콘드리아 내에 존재하는 후보 MIM의 수준과 형태를 밝히기 위해 후보 MIM을 처리한 세포로부터 분리한 미토콘드리아 농축 샘플(preparations)을 분석하였다. 외적으로 후보 MIM을 추가함에 따라 미토콘드리아 내 후보 MIM의 수준이 시간의존적이고 농도의존적으로 증가하는 것을 확인했다. 추가적으로 총 세포 단백질 샘플에 대해 기술된 것과 같이 2-D 겔 전기영동을 이용해 미토콘드리아 농축 샘플에서의 단백질 수준 변화를 분석하였고 질량분석법을 이용해 단백질 식별을 분석하였다. 세포내에 들어가 존재하고 미토콘드리아에 증가된 수준으로 존재하는 후보 MIM을 MIM으로 식별하였다. 평가하는 시간 동안에 세포에서 또는 예를 들면, 미토콘드리아에서의 후보 MIM의 수준은 예를 들면, 특정 단백질에 대한 mRNA와 단백질 수준의 조절과 같이 관찰된 세포적 변화와 밀접한 연관성이 있다.

[0504] mRNA 혹은 단백질 수준에서 유전자 발현과 같이 세포의 구성물질의 변화를 유도하는 것으로 관찰된 후보 MIM을 MIM으로 식별하였다. 정상적인 상태 (비암적인)와 비교하여 질병상태 (암적인)에서 세포 형태, 생리 및 구성물질 (mRNA 혹은 단백질 수준에서 유전자 발현의 차별된 변화)에서의 차별적 변화를 유도하는 것으로 관찰된 후보

MIM을 특히 다양한 특징을 가지고 있는 MIM으로 식별하였다. 후보 MIM이 치료적 효과뿐만 아니라 매개체 효과를 보여주기 때문에 세포 안으로 들어갈 수 있는 후보 MIM을 특히 다양한 특징을 가지고 있는 MIM으로 식별하였다.

- [0505] 실시예 17: 종양학적 질병에 관련된 epi-전환인자로서의 CoQ10의 발견
- [0506] 대조군 세포주 (각질세포(keratinocyte)와 멜라닌세포(melanocyte)의 초대배양(primary culture))와 여러 피부 암 세포주 (SK-MEL-28, 비전이성 피부 흑색종, SK-MEL-2, 전이성 피부 흑색종, SCC, 편평상피암(squamous cell carcinoma), PaCa2, 췌장암 세포주, HEP-G2, 간암 세포주)로 구성된 피부 세포주의 패널에 조효소 Q10을 처리하였다. 암세포주는 대조군 세포주와 비교하여 변화된 농도 의존적인 반응을 보였고 암세포에서만 세포사멸이 발생하였다. 예시적인 실험의 자세한 내용은 실시예 3에서 제시되었다.
- [0507] 어레이는 CoQ10을 상기 명시된 세포에 처리한 후에 mRNA와 단백질 수준이 변화하는 것을 측정하기 위해 사용되었다. mRNA 발현의 변화는 각 세포사멸, 산화적 스트레스와 산화방지제, 혈관생성 및 당뇨병에 특정화된 실시간 PCR 마이크로어레이 분석을 이용하여 분석하였다. 단백질 발현의 변화는 항체 마이크로어레이 분석과 웨스턴 블롯 (Western Blot) 분석을 이용하여 분석하였다. 이러한 분석 결과를 통해 조효소Q10에 의해 세포주에서 mRNA수준과 단백질 수준에서 유전자 발현에 유의한 변화가 발생하는 것을 보여주었다. 세포 대사과정에 관련된 것으로 알려진 많은 유전자가 CoQ10처리 결과 발현이 조절되는 것을 관찰하였다. 예를 들어, 핵수용체 단백질 HNF4A의 발현은 Q10처리 이후에 증가되었다. 트랜스알도라제1(TAL)의 발현도 역시 Q10처리 이후에 조절되었다. TAL은 NADPH와 반응적인 산소 중간체의 균형을 맞추으로써 ATP합성과 세포의 생존에 매우 중요한 체크 포인트인 미토콘드리아 막안팎(trnas-membrnaed)의 전기적 포텐셜을 조절한다. 종양학적 질병과 특별히 관련된 것으로서 세포사멸, 암 그리고 세포 성장등에 관련된 것으로 알려진 많은 유전자들이 Q10에 의해 조절되고 있음이 밝혀졌다. 예시적인 실험의 자세한 내용은 실시예 4, 6, 7, 8 및 9에서 제시되었다.
- [0508] Q10은 에너지 생산을 위한 미토콘드리아 안에서의 산화성인산화반응 (oxidative phosphorylation) 프로세스에 필수적인 보조인자이다. 미토콘드리아 내부에 존재하는 조효소Q10의 형태와 수준은 CoQ10을 처리한 세포로부터 분리한 미토콘드리아 농축 샘플(preparations)을 분석하여 밝혔다. 외부에서 Q10을 추가함에 따라 미토콘드리아 내 조효소Q10의 수준이 시간의존적이고 농도의존적으로 증가하는 것을 확인했다. 대사적 그리고 세포사멸적 기전과 관련된 특정 단백질에 대한 mRNA 및 단백질 수준의 조절에서 관찰된 바와 같은 매우 다양한 세포적 변화들은 시간 진행과 밀접한 연관성이 있었다. 예시적인 실험의 자세한 내용은 실시예 5에서 제시되었다.
- [0509] 여기에 기술된 결과를 통해 내재적인 CoQ10을 epi-전환인자로 식별하였다. 특히 CoQ10이 세포내 대사적 상태를 이동시키고 부분적으로 미토콘드리아 기능을 복원시켰다. 여기에 기술된 데이터의 해석과 현재 알려진 내용을 바탕으로 위와 같이 결론내릴 수 있다.
- [0510] Q10은 합성되어 미토콘드리아 내막 안으로 이동되고, 축적되며 사용되는 것으로 알려져 있다. Q10은 또한 미토콘드리아 내에서 에너지 생산을 하는 산화적 인산화반응에 필수적인 보조인자로 알려져 있다. 하지만, 정상세포의 미토콘드리아에서 피루브산(pyruvate)을 산화시킴으로써 에너지를 생산하는 것과는 달리 대부분의 암세포에서는 세포기질(cytosol) 내 젖산(lactic acid)의 발효에 따른 해당과정을 통해 대부분 에너지를 생산한다. 산화적 인산화반응은 전자전달체와 시토크롬C (cytochrome C)과 관련된다. 세포사멸은 세포사멸을 촉진하는 인자에 의한 미토콘드리아 막이 투과될 수 있도록 바뀌면서 미토콘드리아가 파열되는 것과 관련된다. 상이한 대사적 에너지 합성 기전을 이용함으로써 암세포는 세포의 이상에 대한 정상적인 세포사멸 반응을 완화시킬 수 있다. 이론에 얽매이지 않기 위하여, 출원인은 Q10이 산화적 인산화반응 기전 단백질의 발현을 증가시킴으로써 암을 유발하는 결함을 인지하고 세포사멸을 유발하는 상태로 미토콘드리아의 기능을 바꿔주는 기능을 한다고 제안한다. 따라서, Q10은 세포의 대사적 상태를 바꿈으로써 epi-전환인자로서의 역할을 한다
- [0511] 실시예 18: 종양학적 질병에 관련된 epi-전환인자의 발견
- [0512] 대조군 세포주 (각질세포(keratinocyte)와 멜라닌세포(melanocyte)의 초대배양(primary culture))와 암세포주 (SK-MEL-28, 비전이성 피부 흑색종, SK-MEL-2, 전이성 피부 흑색종, SCC, 편평상피암(squamous cell carcinoma), PaCa2, 췌장암 세포주, HEP-G2, 간암 세포주)로 구성된 피부 세포주의 패널에 후보 epi-전환인자를 처리하였다. 후보 epi-전환인자에 대한 세포의 민감도(sensitivity)와 세포사멸적 반응을 측정함으로써 세포의 형태학적 및 생리학적 변화를 평가하였다. 본 시험은 예 3에서 기술된 방법으로 수행되었다. 간략히 설명하면, 가능한 MIM에 대한 세포주의 민감도는 여러 농도 범위에 걸쳐 여러 시간대별로 세포의 생존을 관찰하여 측정하였다. 가능한 epi-전환인자에 대한 세포주의 세포사멸 반응은 예를 들어 Nexin물질과 유세포분석기 (flow cytometry) 방법을 결합한 방법을 사용하여 측정하였다. Nexin물질은 2개의 염색체와 7AAD 및 Annexin-V-PE로

구성되어 있으며 세포사멸의 초기와 말기에서 세포의 수를 정량할 수 있다. 또 다른 세포사멸 측정방법은 APOSTRNADTM ELISA 방법을 통해 단일가닥(single-stranded) DNA를 측정하는 방법도 있다. 질병 세포주와 대조군 세포주의 민감도와 세포사멸성 반응도를 측정하고 비교하였다. 정상적인 혹은 대조군 세포와 비교해 암세포에서 후보 epi-전환인자가 우선적으로 혹은 선택적으로 세포의 성장을 억제하는 능력을 가졌는지 평가하였다. 추가적으로 정상적인 혹은 대조군 세포와 비교해 암세포에서 후보 epi-전환인자가 우선적으로 혹은 선택적으로 세포사멸을 유도하는 능력을 가졌는지 평가하였다.

[0513] 후보 epi-전환인자를 처리한 후에 상기 식별된 세포의 mRNA와 단백질 수준에 변화가 있는지 알아보기 위해 분석하였다. 실시간 PCR 마이크로어레이 방법을 통해 mRNA 수준의 유전자 발현 변화를 분석하였다. 이 실험은 상기에 6과 예 9-13에서 설명된 방법으로 수행되었다. 간략히 설명하면, 처리 후 다양한 시간대에서 mRNA를 세포로부터 추출하였다. 특정 기전에 관련된 유전자의 mRNA 발현 수준은 세포사멸, 산화적 스트레스, 항산화 방어, 신생혈관생성, 열충격(heat shock) 혹은 당뇨병에 대한 어레이들을 포함하는 표적기전 (targeted pathway) 어레이를 이용하여 평가되었다. mRNA 전사수준이 2배 이상 변화된 유전자를 선별하여 분석하였다.

[0514] 항체 마이크로어레이 방법과 질량분석법과 연결된 2-D 겔 전기영동법 및 웨스턴 블롯을 통해 단백질 발현의 변화를 분석하였다. 이러한 실험들은 실시예 7, 4 및 8에서 각기 설명된 방법처럼 수행되었다. 간략히 설명하면, 후보 epi-전환인자 처리 후 6시간째 혹은 24시간째와 같이 다양한 시간대에서 용해성 단백질을 세포로부터 추출하였다. 다양한 범위의 단백질 종류와 가능한 기전 마커와 같은 700여개 이상의 단백질에 대한 항체를 포함하고 있는 항체 어레이를 사용하여 후보 epi-전환인자에 의한 단백질의 수준변화를 평가하였다. 더 나아가 상호보완적인 단백질체학(proteomic) 분석을 2-D 겔 전기영동과 질량분석법을 이용하여 수행하였다. 후보 epi-전환인자를 세포주에 외적으로 추가하였고 세포 덩어리를 용해하여 2-D 겔 전기영동에 사용하였다. 처리되지 않은 샘플인 대조군에 비해 처리받은 샘플에서 단백질 수준변화를 식별하기 위해 겔을 분석하였다. 증가 혹은 감소된 수준 혹은 단백질변역 후 변역(post-translational modification)에 따른 처리시간에 따른 점의 변화를 식별하기 위해 겔을 분석하였다. 통계적으로 유의한 변화를 보이는 점을 절제하여 트립신을 사용해 분해하고 질량분석법을 통해 단백질을 식별하였다. 식별된 펩타이드를 단백질을 찾는 Mascot와 MS RAT 소프트웨어 분석과 같은 단백질 데이터베이스를 통해 검색하였다. 앞선 2-D 겔 전기영동과 항체 마이크로어레이 실험에 추가해서 후보 MIM에 의해 유도된 특정 단백질의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 평가하였다. 이러한 모든 단백질체학 실험에서 다양한 세포주에서 발현이 증가되거나 감소되는 단백질을 식별하고 평가하였다.

[0515] 후보 epi-전환인자를 추가함에 따라 세포주에서 mRNA 및 단백질 수준에서 유전자 발현에 변화에 근거하여 후보 epi-전환인자를 평가한다. 특히 후보 epi-전환인자가 세포적 대사과정에 관련된 것으로 알려진 유전자를 조절하는 능력이 있는지 평가한다. 종양학적 질병과 특별히 관련된 것으로서 후보 epi-전환인자가 세포사멸, 암 그리고 세포 성장등에 관련된 것으로 알려진 유전자를 조절하는 능력이 있는지 평가하였다.

[0516] 세포내 혹은 특정 세포내 위치에 후보 epi-전환인자의 수준과 형태를 알아보기 위해 기술자에게 알려진 방법을 이용하였다. 예를 들어, 여러 시간과 다양한 농도에 있어 미토콘드리아에서 후보 epi-전환인자의 수준을 알아보기 위해 후보 epi-전환인자를 처리한 세포로부터 미토콘드리아 농축 샘플을 준비하여 분석하였다. 여러 시간대의 후보 epi-전환인자의 수준을 대사적 그리고 세포사멸적 기전에 관계된 특정 단백질에 대한 mRNA와 단백질 수준의 조절과 같이 관찰된 다른 세포적 변화와 비교하고 상관성이 있을 수 있다.

[0517] 선행 실험에서 얻은 결과에 근거하여 세포의 대사적 상태를 변화시키는 것으로 관찰된 후보 epi-전환인자를 epi-전환인자로 식별하였다. 예를 들어, 세포에서 세포독성이나 세포사멸적 반응을 유도하는 후보 epi-전환인자를 epi-전환인자로 식별하였다. 또한 정상 세포에 비교해 질병(암) 세포에서 차별된 세포독성을 보이거나 혹은 차별화된 세포사멸적 반응을 유도하는 후보 epi-전환인자 (즉 정상세포에 비교해 암세포에서 세포사멸에 관련된 단백질의 발현을 차별적으로 조절하는 epi-전환인자)를 epi-전환인자로 식별하였다.

[0518] 실시예 19: epi-전환인자로서의 비타민 D3의 발견

[0519] 비타민 D3 또는 1 $\alpha$ , 25-디히드록시비타민 D3 (혹은 칼리스티올로도 알려짐)는 2단계 효소적 과정에 의해 비타민D로부터 합성되는 비타민D의 대사체이다. 비타민 D3은 어디에나 존재하는 핵 비타민D 수용체 (VDR)과 상호작용하여 칼슘과 인산염의 항상성(homeostasis) 및 세포의 분열과 분화에 관련된 다양한 유전자의 전사를 조절한다. 비타민 D3은 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 전립선암종(prostate adenocarcinoma), 난소암, 유방암 및 폐암 등과 같은 다양한 모델 시스템에서 항암성 효과가 있다고 알려져 있다 (Deeb et al. 2007 Nature Reviews Cancer 7:684-700에서 리뷰).



- [0520] 비타민 D3의 항암효과는 세포주기의 G1단계에서 성장중단, 세포사멸, 종양세포의 분화, 성장인자를 통한 세포의 생존신호의 파괴 및 신생혈관생성과 세포부착의 억제 등과 같은 다양한 메커니즘에 관련되어 있다고 보고되었다 (Deeb et al. 2007 Nature Reviews Cancer 7:684-700에 리뷰되어 있음). 예를 들어, 세포사멸에 대하여 비타민 D3은 항-세포사멸 단백질 BCL2와 생존촉진 단백질 BCL-XL의 발현을 억제하거나 세포사멸을 촉진하는 단백질 (예를 들면, BAX, BAK 및 BAD)의 발현을 유도하는 것과 같이 세포사멸의 중요 매개체를 조절함으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Deeb et al. 2007). 추가적인 예로는, 신생혈관생성에 대하여 비타민 D3은 어떠한 종양유래 내피세포의 증식을 억제하고 종양의 신생혈관생성을 유도하는 혈관내피세포성장인자 (VEGF)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Masuda and Jones, 2006 Mol. Cancer Ther. 5(4): 797-8070에서 리뷰). 또 다른 예로는, 세포주기의 중단에 대하여 비타민 D3은 G1단계에서의 중단을 유도하는데 중요하다고 알려진 사이클린 의존적 키나제 억제제 (cyclin-dependent kinase inhibitor) p21WAF1/CIPI의 유전자 전사를 유도하고 사이클린 의존적 키나제 억제제 (cyclin-dependent kinase inhibitor) p21WAF1/CIPI 단백질을 합성이나 안정화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Deeb et al. 2007).
- [0521] 선행 관찰에 근거하여 세포의 대사적 상태를 바꿀 수 있는 능력을 가진 비타민 D3를 epi-전환인자로 식별하였다. 비타민 D3은 세포의 세포사멸을 유도할 수 있는 능력이 있으며 특히 세포의 성장을 차별적으로 억제할 수 있으며 정상 세포에 비교해 질병(암) 세포에서 세포사멸적 반응을 유도할 수 있는 능력에 비추어 epi-전환인자로 식별하였다. (즉 정상세포에 비교해 암세포에서 세포사멸에 관련된 BCL-2, BCL-XL, 그리고 BAX 등과 같은 단백질의 발현을 차별적으로 조절함)
- [0522] 실시예 20: 종양성 세포와 정상세포의 조효소Q10에 대한 상대적 민감도
- [0523] 다양한 종양성 세포주와 정상 세포주에 대한 조효소Q10에 대한 효과를 검사하고 비교하였다. 조효소Q10에 대한 세포의 민감도는 세포사멸 유도를 관찰함으로써 평가하였다. 세포에 대한 CoQ10의 처리는 아래 물질과 방법 (Material and Method)에 상세히 기술된 것처럼 수행되었다. 세포사멸의 유도는 처리된 세포에서 아래 기술된 것과 같이 초기 세포사멸에 대한 지표 (예를 들면, Bcl-2 발현, 캐스파제(카스파아제) 활성화, 아넥신V(annexin V) 분석을 이용한 방법)를 관찰함으로써 평가하였다. 이러한 연구로부터 세포주 패널에서 세포사멸을 유도하는데 필요한 최소 CoQ10 용량, 즉 CoQ10의 농도와 처리시간을 결정하였다.
- [0524] 예상치 못하고 놀랍게도 조효소Q10처리의 효과는 증가된 발암성과 보다 큰 전이가능성을 보인 세포 타입, 즉 보다 공격적인 암이나 종양에서 유래한 세포 타입에서 보다 크게 나타나는 결과가 나왔다. 이러한 결과는 표 29에 정리되었다. CoQ10이 보다 공격적인 암 상태에 있는 세포에서 시간과 농도 의존적으로 보다 효과적인 결과를 나타내는 것으로 나타났다. 더구나 종양성 세포와 비교해서 정상 세포에서 놀라운 확산적 효과가 관찰되었다. 구체적으로 조효소Q10은 케라틴 세포와 피부 섬유아세포(fibroblast) 등과 같은 정상세포에서 증가된 증식과 이동이 관찰되는 정상 조직 환경에서 약간의 도와주는 역할을 하는 것이 예상치 못하게 발견되었다.
- [0525] 암에서의 유전자 조절과 단백질 메커니즘에 대한 조효소Q10의 효과는 정상세포와는 다르다. 막 유동성, 운송 메커니즘, 면역제어, 신생혈관생성, 세포주기 조절, 계놈의 안정성, 산화성 조절, 해당작용의 흐름, 대사적 조절 및 세포의 기질 단백질 등과 같은 중요한 세포의 조직과 구성물이 제대로 기능하지 못하고 있으며 따라서 세포의 유전자 지문(genetic fingerprint)과 분자적 지문(molecular fingerprint)이 변경된다. 질병적 환경이 세포의 조절 프로세스의 관리를 선호한다. CoQ10은 세포사멸 잠재성을 복원시키는 방법으로 앞서 언급한 중요한 프로세스 중 일부를 정상화 시킴으로써 상당한 수준의 효과(암세포와 정상세포의 비교 시, 보다 더 공격적인 암 상태의 세포와 보다 덜 공격적이거나 공격적이지 않은 암 상태의 세포의 비교 시)를 발휘하는 것으로 보여진다.

표 29

다양한 세포 유형에서 조기 아폽토시스의 유도를 위해 요구되는 최소 CoQ10 농도 및 치료 시간

조직 기원 (세포 유형)	조기 아폽토시스의 지표 (Bcl-2, 어벡신 V, 또는 카스파제 활성화)	농도 ( $\mu$ M)	시간 (hr)	공격성의 수준: 1 = 정상 조직 2 = 악성 3 = 전이
<b>피부:</b>				
케라틴단세포 (Heka, Hekn)	무	N/A	N/A	1
섬유아세포 (nFib)	무	N/A	N/A	1
색소세포 (Hema, LP)	무	N/A	N/A	1
흑색종 (Skme1 28)	강함	20	24	2
흑색종 (Skme1 2)	매우 강함	25	24	3
SCC, 편평세포 암종	매우 강함	25	24	3
<b>유방:</b>				
MCF-7	강함	50	48	2
SkBr-3	매우 강함	50	24	3
BT-20	강함	100	48	2
ZR-75	약함 <sup>t</sup>	200	72	2
MDA MB 468	강함	100	48	2
포유동물 섬유아세포: 184A1 및 184B5) (Lawrence Berkeley)	무	N/A		1
<b>전립선:</b>				
PC3	매우 강함	25	24	3
<b>간</b>				
HepG2	매우 강함	50	24	3
Hep3B	매우 강함	50	24	3
<b>골:</b>				
골육종 (143b)	매우 강함	50	48	2
어원 육종 (NCI)	매우 강함	5	1	3
<b>췌장:</b>				
PaCa2	매우 강함	25	24	3
<b>심장:</b>				
대동맥 평활근 (HASMC)	무	N/A	N/A	1

[0526]

[0527] 물질과 방법

[0528] 세포준비 및 처리

[0529] 디쉬(dish) 혹은 플라스크에 준비된 세포

[0530] T-75 플라스크에 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1% PSA (페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신 B)과 함께 관련 배지를 넣어 5% 이산화탄소가 공급되는 37°C 인큐베이터에서 70~80%의 컨플루언스(confluence)가 도달할 때까지 세포를 배양한다. 처리를 위해 세포를 수거하기 위하여 1mL 트립신을 플라스크에 처리한 뒤 흡입하여 제거하고 다시 3mL 트립신을 처리한 뒤 37°C에서 3-5분간 인큐베이트 한다. 동일한 양의 배지를 (3mL 배지) 추가하여 중화시키고 그 다음에 용액을 8분간 10,000rpm으로 원심분리시킨다. 상청액을 흡입하여 제거하고 세포를 8.5mL 배지에 재부유(resuspended)시킨다. 재부유시킨 용액의 500ul와 이소프로판올 9.5mL를 섞은 혼합체를 콜터 계수기 (coulter counter)를 이용하여 2번 측정하고 각 접시에 담을 적절한 세포 수를 결정하였다. 대조군과 0-200  $\mu$ M 농도범위의 그룹들을 3회씩 검사하였다. 500  $\mu$ M CoQ10 원액으로부터 순차적인 희석을 수행하여 각 접시에 희망하는 실험 농도를 준비하였다. 세포 종류와 실험 프로토콜에 따라 각 접시는 5% 이산화탄소가

공급되는 37℃ 인큐베이터에서 0-72시간동안 배양하였다.

- [0531] 단백질 분리 및 정량
- [0532] 디쉬에 준비된 세포
- [0533] 처리된 세포의 배양이 완료된 후에 단백질 분리를 수행하였다. 처리군의 접시들은 얼음처럼 차가운 1X 인산완충 식염수(Phosphate Buffered Saline , PBS) 2mL를 사용하여 2번 씻은 후에 한번 더 1mL를 사용하여 씻는다. 처음 두 번의 PBS만 흡입하여 제거한다. 마지막 PBS 양을 이용하여 세포를 부드럽게 긁어모아서 마이크로센트리퓨즈 튜브에 담고 10분간 10,000rpm으로 원심분리시킨다. 원심분리 이후, 상청액을 흡입하여 제거하고 50 μL의 용해 버퍼 (100 μL의 용해 버퍼마다 1μL의 프로테아제와 인산염 억제제 포함)를 이용하여 세포 덩어리를 용해시킨다. 샘플은 영하 20℃에서 밤새 얼린다.
- [0534] 플라스크에 준비된 세포
- [0535] 처리된 세포의 배양이 완료된 후에 단백질 분리를 수행하였다. 처리군의 접시들은 얼음처럼 차가운 1X 인산완충 식염수(Phosphate Buffered Saline , PBS) 5mL를 사용하여 2번 씻은 후에 한번 더 3mL를 사용하여 씻는다. 처음 두 번의 PBS만 흡입하여 제거한다. 마지막 PBS 양을 이용하여 세포를 부드럽게 긁어모아서 15mL 센트리퓨즈 튜브에 담고 10분간 10,000rpm으로 원심분리시킨다. 원심분리 이후, 상청액을 흡입하여 제거하고 적절한 양의 용해 버퍼 (100 μL의 용해 버퍼마다 1μL의 프로테아제와 인산염 억제제 포함)를 이용하여 세포 덩어리를 용해시킨다. 용해 버퍼의 양은 세포 덩어리의 크기에 따라 다르다. 샘플은 영하 20℃에서 밤새 얼린다.
- [0536] 단백질 정량
- [0537] 단백질 분리 하루 뒤에 샘플을 영하 4℃에서 녹이고 균질화되도록 초음파를 쪼여 분해하였다. 단백질 정량은 마이크로 BCA 단백질 분석 키트 (Pierce)를 이용하여 수행되었다. 면역블롯팅(immune-blotting)을 위한 샘플을 준비하기 위해, 베타메카토포에타놀 (Sigma)를 샘플 버퍼 (Bio-Rad)와 1:19의 비율로 섞어서 준비하였다. 샘플을 베타메카토포에타놀-샘플 버퍼 용액과 1:1로 희석한 뒤에 5분간 95℃에서 끓인 뒤에 영하 20℃에서 밤새 얼렸다.
- [0538] 면역블롯팅
- [0539] Bcl-2, 카스파아제 9, 시토크롬 c
- [0540] 웰당 로딩할 샘플의 양은 BCA 단백질 분석에서 얻은 단백질의 평균농도를 이용하여 결정하였다. 대략 30-60 μg의 단백질이 각 처리 시간대별로 로딩되었다. 12% Tris-HCl 레디겔 (모든 것이 미리 준비되어 판매되는 겔) (Bio-Rad)이나 혹은 직접 손으로 만들어 준비한 겔을 1X 러닝버퍼 (running buffer)에 넣어 85볼트와 100볼트에서 3번씩 단백질을 로딩하여 진행하였다. 이후에 단백질을 니트로셀룰로오스 종이에 100볼트에서 한시간 가량 이동시키고 5%의 우유 용액으로 다시 한시간 가량 차단하였다. 막을 1차 항체 (1μL 항체: 1,000 μL TBST) (Cell Signaling) 용액에 넣어 영하 4℃에서 밤새 놔두었다. 다음날, Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST)를 사용하여 10분간 3번씩 씻은 후 2차 항체 (항-토끼, 1μL 항체: 1,000 μL TBST)를 영하 4℃에서 한시간 가량 적용하였다. 다시 TBST를 사용하여 10분간 3번씩 씻은 후 피코 혹은 웹토 기질을 사용하여 화학발광을 완료하였다 (Pierce). 그 이후 막은 가장 좋은 시각적 결과를 보여주도록 시간을 갖고 현상하였다. 현상 후, 액틴 수준을 측정하기 전까지 영하 4℃에 TBST에 담그어 보관하였다.
- [0541] 액틴
- [0542] 막을 1차 액틴항체 (1uL 항체: 5,000uL TBST) (Cell Signaling) 용액에 넣어 영하 4℃에서 한시간 가량 놔둔 후, TBST를 사용하여 10분간 3번씩 씻은 후, 2차 항체 (항-생쥐, 1uL 항체: 1,000uL TBST)를 영하 4℃에서 한시간 가량 적용하였다. 다시 TBST를 사용하여 10분간 3번씩 씻은 후 피코 기질을 사용하여 화학발광을 완료하였다 (Pierce). 그 이후 막은 가장 좋은 시각적 결과를 보여주도록 시간을 갖고 현상하였다.
- [0543] 아넥신 V 분석
- [0544] 세포를 PBS 10X로 두번 씻은 후 바인딩 버퍼 (0.1M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl<sub>2</sub>)에 재부유시켰다. 100 μl 샘플을 5ul 아넥신-PE 염료 혹은 7-ADD와 함께 배양 튜브에 넣었다. 세포를 섞은 후 실온에서 15분간 빛을 차단하고 배양하였다. 이 후에 400 μl의 1X 바인딩 버퍼를 각 샘플에 추가하였고 유세포 분석기를 이용해 분석하였다.
- [0545] 실시예 21-25는 국제출원 WO 2008/116135로부터 발췌하였다. 여기 내용은 전체를 포함시켰다.

- [0546] 실시예 21: 펜틸렌 글리콜을 포함하는 CoQ10 22% 농축물을 준비하는 방법
- [0547] 지방친화성 물질을 CoQ10과 함께 사용하여 농축물을 생산하였다. 약 10kg의 폴리소르베이트 80을 진공 케틀에 넣고 약 50℃ 내지 약 65℃ 온도로 가열하였다. 약 8.8kg CoQ10을 폴리소르베이트 80에 추가하여 넣고 온도를 약 50℃ 내지 약 65℃로 유지한 상태에서 진공을 걸어, 내용물이 약 15분간 섞이도록 하였다. 이 결과 나온 결과물질을 여기서 앞으로 CoQ10단계 혹은 1단계라고 명명하고자 한다. CoQ10은 밀폐되고, 진공이 걸려있고, 폴리소르베이트/CoQ10 혼합체의 온도가 약 50℃ 내지 약 55℃ 되는 진공 케틀에 폴리소르베이트 80과 함께 녹여졌다.
- [0548] 또 다른 케틀에는, 약 15.8kg의 물을 약 50℃ 내지 약 55℃의 온도로 가열하고 약 0.2kg 페녹시에타놀과 약 2kg HYDROLITE 5® 펜틸렌 글리콜, USP를 물에 넣고 투명하고 균일화될 때까지 섞었다. 이 후에 분산(dispersed)될 때까지 약 8kg PHOSPHOLIPON® 85G를 추가하였다. 이 결과 나온 결과물질을 여기서 앞으로 물의 단계 혹은 2단계라고 명명하고자 한다. 물의 단계는 균일한 분산과 포스포리폰-타입 레시틴의 수화작용을 달성하였고, 약 50℃ 내지 약 55℃의 온도에서 아래 기술된 것과 같이 CoQ10/폴리소르베이트 액체에 추가되었다.
- [0549] 랩스케일 배치를 위한 실버슨 L4RT모델과 유사한 실버슨 즉시 생산 스케일 균질기를 사용하여 위에서 언급한 두 개의 단계 (즉, CoQ10단계와 물의 단계)을 혼합하였다. 밀폐된 재순환 루프를 통하여 진공하(약 18mm Hg 내지 약 20mm Hg)에서 약 50℃ 내지 약 55℃의 온도에서 부드럽게 섞어주어서 가용성의 CoQ10이 완전히 압축되고 균일하게 분산되어 두껍고 균일한 지질로 둘러싸인 분산을 만들어 낼 수 있도록 최대용량 (약 7000rpm 내지 약 10,000rpm)으로 총 약 5분간 혼합하는 실버슨 표준 에멀전 헬멧 (head screen)을 사용하여 균질화를 만들었다. 이 결과 CoQ10 농축액은 무게로 약 22% 정도의 농도를 가지는 CoQ10이 되었다. PHOSPHOLIPON® 85G의 전체 구성물의 무게로 약 8%정도 되었으며 이것은 위에서 언급한 두 개의 단계의 조합이다.
- [0550] 별도의 실험에서, 위에서 언급한 22% CoQ10 농축액의 1kg 랩 배치를 생산하면서 균질화 동안에 5분간격으로 샘플을 채취하였다. 각 다양한 샘플채취 시간에서의 리포솜의 입자 크기는 생산자의 방법을 따라 레이저 회절 기기를 사용하여 측정하였다 (Malvern 2000). 균질화 프로세스와 균질화 과정에서 얻은 입자 크기에 대한 자세한 내용은 표 30에 정리되었다.

표 30

프로세싱 시간 (minutes)	실버슨 L4RT 헤드 속도	평균. 입자 직경(nm)	입자 강도; % < 300nm	대략적. 피크 온도. 노출(℃)
5	7000	108	84.9	55
10	7000	162	57.8	65
15	7000	112	85.4	55
20	7000	149	67.0	62
30	7000	120	83.0	55
45	7000	107	85.0	55

- [0551]
- [0552] 표 30에서 보듯이, 위에서 언급한 CoQ10 농축액의 제조법과 프로세스는 평균 107nm의 지름을 가진 리포솜을 생산할 수 있으며 약 59nm 내지 약 279nm 안쪽의 크기를 가진 모든 리포솜의 85%를 포함하는 입자 분포를 가진다. 짧은 프로세스 시간 (약 5분)으로도 긴 프로세스 시간 (약 45분)과 동일한 수준의 효율을 가지고 CoQ10의 리포솜 분산을 만들 수 있었다. 위에서 본 바와 같이, 최적의 리포솜 입자는 CoQ10이 약 55℃ 이상의 온도에 노출되지 않았을 때 얻어졌다.
- [0553] 실시예 22: 2% 카보머 분산을 준비하는 방법
- [0554] 교차결합된 아크릴산 중합체 분산을 크림 조성물에서 점성 물질로 사용하기 위해 준비하였다. 아크릴산으로 사용된 CARBOMER 940은 아래 표 31에 나타난 조성물들과 함께 2% 분산으로 준비되었다.

표 31

상	상품명	CTFA 명칭	%	양(kg)
1	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.500	0.0750
1	하이드롤리트-5	펜틸렌 글리콜	5.000	0.7500
2	정제수, USP	물	92.500	13.8750
3	ACRITAMER 940	CARBOMER 940	2.000	0.3000
	총계		100.000	15.0000

[0555]

[0556]

[0557]

[0558]

[0559]

[0560]

[0561]

[0562]

생산 과정은 다음과 같이 수행되었다. 기기를 우선 깨끗이 청소하고 살균처리 하였다. 벤치탑에서 1 단계 구성 요소를 투명하고 균일화될 때까지 섞어주었다. 필요한 물(2 단계)의 양을 정량하고 실시예 1에서 설명된 균질기의 케틀에 추가하였다. 물은 뜨거운 물이나 스팀 자켓으로 약 60℃ 내지 약 65℃까지 가열되었다. 이 후에 첫 번째 단계를 두 번째 단계인 물에 추가하였고 투명하고 균일화될 때까지 적당히 섞어주었다. 첫 번째 단계가 담겨졌던 용기는 프로세스 물로 행구었고 온도는 약 60℃ 내지 약 65℃로 유지되었다. 섞어주는 속도를 높임과 동시에 CARBOMER 940 분말(3회째 단계)을 추가하였다.

온도는 약 60℃ 내지 약 65℃로 유지되었고 모든 CARBOMER 940 분말이 추가될 때까지 섞어주는 속도는 약 500rpm 내지 약 800rpm의 중상으로 유지되었다. CARBOMER 분말은 첫 번째 단계와 두 번째 단계의 혼합체의 소용돌이에 천천히 추가되었다. 분말은 CARBOMER의 모든 양이 10분 이내에 추가될 수 있도록 천천히 손으로 이동되었다.

"은점"이 존재하지 않고 모든 분말이 완전히 분산될 때까지 중상의 속도로 계속 섞어주었다. 모든 중화되지 않은 CARBOMER 940 분말이 완전히 분산되어 부드러운 반투명한 완전히 수화된 CARBOMER중합체의 분산을 생성하기 위해 생산 프로세스를 수행하였다. 배양배치가 될 정도로 빠르지는 않지만 눈으로 볼 수 있을 정도의 소용돌이를 만들 정도로 배치를 빠르게 섞어주었다. 약 60분 내지 약 90분에 걸쳐 약 800rpm 내지 약 1300rpm의 속도로 적당히 배치를 섞어주었다. 섞어주는 초기에 온도는 약 60℃ 내지 약 65℃로 유지되었고, 섞어주는 도중에는 약 55℃ 내지 약 65℃로 유지되었다. 온도의 증가는 CARBOMER 중합체의 분산을 도와주며 응집되는 것을 방지해준다.

배치는 재킷을 통한 차가운 물을 통해 약 25℃ 내지 약 30℃로 식혀지면서 중상의 속도로 계속 섞어주었다. 마이크로 폼질과 pH, 특정 중력 및 점도를 측정하기 위해 샘플을 채취하였다.

실시예 23: CoQ10 22% 농축액을 이용하여 CoQ10 크림 (1.5%, 3.0% 및 5.0%)을 제조하는 방법

크림 에멀전 베이스는 예1에서의 리포솜을 포함하고 있는 CoQ10 농축액과 함께 여러 단계를 사용하여 형성된다. A, B, C 및 상 D가 결합되어 베이스 크림을 형성한다. 상 E는 예 1에서의 CoQ10 22% 농축액 (22% w/w CoQ10)이다. 크림 에멀전 베이스를 준비하고 이어진 실시예 1에서의 CoQ10 22% 농축액을 추가하는 자세한 내용은 아래 설명되었다

CoQ10 22% 농축액을 포함하는 1.5중량%의 크림을 준비하기 위하여 ("CoQ10 크림 1.5%"), 아래 표 32-37에 재료들과 함께 다양한 단계를 결합하는 단계는 아래와 같다.

표 32

CoQ10 크림 1.5%

상	상품명	CTFA 명칭	%	양(kg)
A	리타몰리언트 TN	C12-C15 알킬 벤조에이트	5.000	1.0000
A	RITA CA	세틸 알코올	2.500	0.5000
A	RITA SA	스테아릴 알코올	2.000	0.4000
A	RITAPRO 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500	0.9000

[0563]

[0564]

상 A ("오일상")는 피부연화와 잘 펼쳐지도록 하기 위해 가벼운 에스테르 화합물인 C12-15 알킬 벤조에이트를 포함하고 있다. 세틸 알코올과 스테아릴 알코올은 크림에 바디감 혹은 질감을 주기 위해 추가되는 왁스이고 글리세릴 스테아레이트와 PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 수중유형 (o/w)에멀전을 형성하기 위해 포함된 주요 유화제이다. 벤치탑에서 상 A 재료들은 진공 케틀에서 계량되었고 물통에서 약 70°C 내지 약 75°C까지 가열되었다.

표 33

상	상품명	CTFA 명칭	%	양(kg)
B	RITA 글리세린	글리세린	2.000	0.4000
B	하이드롤리트-5	펜틸렌 글리콜	2.125	0.4250
B	트랜스쿠틀 P	에톡시디글리콜	5.000	1.0000
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.463	0.0926
B	ACRITAMER 940, 2% 분산	물, CARBOMER 940	50.000	10.0000
B	정제수, USP	물	11.000	2.2000

[0565]

[0566]

상 B ("수상")는 피부를 촉촉하게 하고 보습력을 위해 글리세리드를 포함하고; 보습력을 위해 프로필렌글리콜을 포함하고; 피부안으로 잘 스며들게 하도록 도와주며 미생물학적 차단을 증가시키기 위하여; 리포솜의 CoQ10이 피부 안으로 잘 스며드는 것을 증가시키기 위해 에톡시디글리콜을 포함하고; 미생물학적 차단을 위해 페녹시에탄올을 포함하고; 단계용매로서 정제수를 포함하고; 크림 제조의 유동학적 특성을 조절하고 주요 에멀전에 대한 안정성을 추가하기 위해 위 실시예 2에서의 CARBOMER 940 분산을 포함하고 있다.

[0567]

상 B 재료들은 별도의 케틀에 넣었다. 약 70°C 내지 약 75°C의 온도로 가열하면서 중간정도의 속도로 재료들을 부드럽게 섞어주었다. (진공 없음). 상 B 재료들이 약 70°C 내지 약 75°C의 온도에 도달하였을 때, 상 A 재료를 약 70°C 내지 약 75°C의 온도에서 추가하여 중간정도의 속도로 부드럽게 섞어주었다. 상 A와 상 B의 혼합물은 위의 실시예 1 (표준 헬멧)에서 설명된 실버슨 균질기를 통해 재순환되고 프로세스 다음 단계까지 계속된다.

표 34

상	상품명	CTFA 명칭	%	양(kg)
C	테알란 99%	트리에탄올아민	1.300	0.2600
C	RITALCA LA USP	젖산	0.300	0.600
C	RITALAC NAL	소듐 락테이트, 물	2.000	0.4600
C	증류수	물	3.312	0.6624

[0568]

[0569] 상 C ("중화 및 버퍼 상")에서, 정제수는 용매 역할을 하면서 본 단계에서 다른 재료들에 대한 희석액 역할을 한다. 트리에탄올아민은 물의 단계 (상 B)에서 CARBOMER 아크릴산 공중합체에 대한 주요 중화물이다; 젖산나트륨 용액 (물에서의 60% w/w)과 젖산을 크림의 최종 pH를 피부의 자연적 pH 범위인 약 5 내지 약 5.5로 유지하고 조정하기 위해 버퍼시스템에 추가하였다.

[0570] 벤치탑에서, 상 C 재료를 계량하고 균일화될 때까지 섞어주고 약 60°C 내지 약 65°C까지 가열하였다. 상 C 혼합물은 A단계와 B단계가 담긴 진공 믹싱 케틀에 추가되었고 중상의 속도로 부드럽게 섞어주었다.

[0571] 프로세스 다음 단계로 이동하면서 계속해서 섞어주었다.

표 35

상	상품명	CTFA 명칭	%	양(kg)
D	이산화티탄, #3328	이산화티탄	1.000	0.2000

[0572]

[0573] 상 D ("색소 상"). 이산화티타늄 분말의 수화성 품질을 최종 크림 색상을 좀 더 밝게하기 위한 목적으로 제조법에 사용하였다. CoQ10에 의해 생긴 노랑-주황색은 대체로 감소되고 화장용으로 약 1% w/w 이산화티타늄을 첨가하여 개선하였다.

[0574] 프로세스의 상 D를 위해 TiO<sub>2</sub> 를 배치 (상 A, B 및 상 C)에 추가하여 섞어주고 약 10분간 실버슨 균질기 (high shear head)를 통해 재순환하거나 혹은 완전히 균질화되고 퍼질 때까지 재순환하였다. (색깔을 확인하였다.)

[0575] 부드럽게 섞어주는 블레이드에 이산화티타늄이 응결되거나 응집되지 않는 것이 매우 중요하다. 이것은 육안으로 확인할 수 있다. 실시예 1에서 언급한 실버슨 균질기를 사용하여 이산화티타늄이 잘 부수어지고 응결되지 않도록 하였다. 최종 이산화티타늄의 분산은 입도계(grind guage)의 Hegman PH-175 분말도를 이용하여 측정하였다.

표 36

상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
E	CoQ10 농축액 22% (상기 실시예 1로 부터)	물, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 레시틴, 펜틸렌 글리콜, 페녹시에탄올	7.500	1.5000
총			100.000	20.000

[0576]

[0577] 재순환을 멈추고 배치를 약 30rpm의 속도로 천천히 배양액을 섞어주면서 약 50℃ 내지 약 55℃로 식혔다. 예 1에서 사전에 계량한 CoQ10 22% 농축액 (상 E)를 약 45℃ 내지 약 50℃로 따뜻하게 데우고 배치(상 A, B, C 및 상 D)에 추가하였다.

[0578] 모든 단계는 균질화 될 때까지 약 60rpm의 속도로 천천히 휘저어 섞였고 진공을 적용하였다. 온도는 약 50℃로 유지하였다.

[0579] 진공 상태에서 약 60rpm의 속도로 천천히 섞으면서 배치를 약 35℃ 내지 약 45℃로 식혔다.

[0580] 이 결과 나온 결과물질을 컨테이너 화물창에 보관하였다.

[0581] CoQ10 22% 농축액을 포함하는 3%의 크림을 준비하기 위하여 ("CoQ10 크림 3%"), 위에서 언급된 CoQ10 22% 농축액을 포함하는 1.5%의 크림 ("CoQ10 크림 1.5%")을 준비하는 과정과 동일한 과정을 진행하면 된다. 아래 표 37-41에 재료들과 함께 다양한 단계를 결합하는 단계는 아래와 같다.

표 37

CoQ10 크림 3%				
상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
A	리타몰리언트 TN	C12-15 알킬 벤조에이트	4.000	0.8000
A	RITA CA	세틸 알코올	2.500	0.5000
A	RITA SA	스테아릴 알코올	2.000	0.4000
A	RITAPRO 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500	0.9000

[0582]

표 38

상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
B	리타 글리세린	글리세린	2.000	0.4000
B	하드롤라이트-5	펜틸렌 글리콜	2.250	0.4500
B	트랜스큐틀 P	에톡시디클리콜	5.000	1.0000
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.463	0.0926
B	아크리타머 940 2% 분산액	물, 카보머 940	40.000	8.0000
B	정제수, USP	물	15.000	3.0000

[0583]



표 39

상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
C	테알란 99%	트리에탄올아민	1.300	0.2600
C	리탈락 LA	락트산	0.500	0.1000
C	리탈락 NAL	소듐 락테이트, 물	2.000	0.4000
C	정제수, USP	물	2.487	0.4974

[0584]

표 40

상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
D	이산화티타늄 #3328	이산화티타늄	1.000	0.2000

[0585]

표 41

상	상표명	CTFA 명칭	%	양(g)
E	CoQ10 농축액 22% (상기 실시예 1로 부터)	물, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 레시틴, 펜틸렌글리콜 페녹시에탄올	15.000	3.0000
	총		100.000	20.000

[0586]

[0587] CoQ10 22% 농축액을 포함하는 5%의 크림을 만들기 위해 약 25중량%의 양으로 실시예 1로부터 CoQ10 22% 농축액을 사용하여 유사한 크림을 제조하였다.

[0588] 표 42, 43 및 44에 각각 CoQ10 크림 1.5%, 3% 및 5%의 내용물에 대해 정리하였다. CoQ10 크림에 대해 위아래로 주어진 모든 제조법 예에서 CoQ10 22% 농축액의 사용된 양이 사실 목표 농도보다 5%정도 높은 CoQ10 22% 농축액의 최종 이론적 농도를 나타냈다. 따라서 CoQ10 크림 1.5%를 만들기 위해서는 CoQ10 22% 농축액의 무게로 7.5%를 사용하여야 1.58% w/w CoQ10을 생산할 수 있다. CoQ10 크림 3%는 CoQ10 22% 농축액의 15%를 사용하여 3.15% w/w CoQ10을 생산할 수 있다. 5%의 여분의 약을 추가하여 제품의 전체적인 유효기간을 증가시켰고 라벨 혹은 예상 약물 내용물의 약 90% 내지 약 110% 사이로 약물 내용물을 유지할 수 있다.

표 42

CoQ10 크림 , 1.5%

상	상표명	INCI 명칭	%	공급원
A	리타몰리언트 TN	C12-15 알킬 벤조에이트	5.000	RITA
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000	RITA
A	리타 SA	스테아릴 알코올	1.500	RITA
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테테레이트	4.500	RITA
B	리타 글리세린	글리세린	2.000	RITA
B	히드롤라이트 5	펜틸렌 글리콜	2.125	SYMRISE
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000	GATTEFOSSE'
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.463	RITA
B	정제수	탈이온수	11.000	
B	아크리타머 940 분산액, 2%	물, 펜틸렌 글리콜, 카보머 940, 페녹시에탄올	50.000	
C	정제수 USP	물	4.212	
C	트리에탄올아민	트리에탄올아민	1.300	RITA
C	리탈락 NAL	소듐 락테이트 및 물	2.000	RITA
C	리탈락 LA USP	락트산	0.400	RITA
D	이산화티타늄 #3328	이산화티타늄	1.000	MPSI
E	CoQ10 리포솜 농축액 22%w/w(실시에 1로 부터)	물, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 레시틴, 펜틸렌 글리콜, 페녹시에탄올	7.500	
	총		100.000	

[0589]

표 43

CoQ10 크림 3%

상	구성 성분	% w/w
A	C12-C15 알킬 벤조에이트	4.000
A	세틸 알코올	2.000
A	스테아릴 알코올	1.500
A	글리세릴 스테아레이트 & PEG 100 스테아레이트	4.500
B	글리세린	2.000
B	펜틸렌 글리콜	2.250

B	에톡시디글리콜	5.000
B	페녹시에탄올	0.476
B	카보머	40.000
B	정제수	16.000
C	소듐 락테이트	2.000
C	정제수	2.474
C	트리에탄올아민	1.300
C	락트산	0.500
D	이산화티타늄	1.000
E	CoQ10 농축액 22% (실시에 1로부터)	15.000
	총:	100.000

[0590]

표 44

CoQ10 크림 5%

상	구성 성분				% w/w
A	C12-C15 알킬 벤조에이트				3.000
A	세틸 알코올				2.000
A	스테아릴 알코올				1.500
A	글리세릴 스테아레이트 & PEG 100 스테아레이트				4.500
B	글리세린				2.000
B	펜틸렌 글리콜				2.000
B	에톡시디글리콜				5.000
B	페녹시에탄올				0.450
B	카보머				35.000
B	정제수				14.000
C	소듐 락테이트				2.000
C	정제수				0.750
C	트리에탄올아민				1.300
C	락트산				0.500
D	이산화티타늄				1.000
E	CoQ10 농축액 22% (실시에 1로 부터)				25.000
				총:	100.000

[0591]

[0592] 주석: 각 CoQ10 크림 1.5%, 3.0%, 5.0% 배치에 CoQ10 22% 농축액을 5% 추가하여 공급하였다. (1.5% + 0.075%, 3% + 0.15%, 그리고 5% + 2.5%)

[0593] 실시예 24: CoQ10 크림 (1.5%, 3.0% 및 5.0%)의 국소적 처리

[0594] 실시예 3에서 생산된 CoQ10을 포함하는 크림 (즉, CoQ10 크림 1.5%, CoQ10 크림 3%, CoQ10 크림 5%)를 돼지 피부에 적용하여 발라보았다. 국소용량시험은 각 수컷1마리와 암컷1마리씩 총 2마리를 사용해 진행하였다. 동물의 각 측면으로 3개의 실험 부분을, 총 6개의 실험 부분을 설정하였다. 각 돼지에서, 한쪽 측면 (3개 실험부분)은 7일동안 하루에 한번씩 약을 처리하였고, 다른 반대편 한쪽 측면 (3개 실험부분)은 단지 1일째 한번만 약을 처리하였다. 에톡시디글라이콜을 사용해 준비한 실시예 3에서 만든 크림은 수컷 동물에 사용되었다. 5% 에톡시디글라이콜 대신에 5% 1,3-부틸렌 글리콜이 들어간 실시예 3에서 만든 크림은 암컷 동물에 사용되었다. 1,3-부틸렌 글리콜을 사용하여 만든 CoQ10 22% 농축액이 1.5%, 3%, 5% 들어간 제조물에 대한 자세한 내용은 각각 표 45, 46 및 47에 정리되었다.

표 45

**CoQ10** 크림 1.5% 노미날 활성  
부틸렌 글리콜 기재

상	구성 성분				% w/w
A	C12-C15 알킬 벤조에이트				5.000
A	세틸 알코올				2.000
A	스테아릴 알코올				1.500
A	글리세릴 스테아레이트 & PEG 100 스테아레이트				4.500
B	글리세린				2.000
B	펜틸렌 글리콜				2.125
B	부틸렌 글리콜				5.000
B	페녹시에탄올				0.463
B	카보머				50.000
B	정제수				11.001
C	소듐 락테이트				2.000
C	정제수				4.211
C	트리에탄올아민				1.300
C	락트산				0.400
D	이산화티타늄				1.000
E	CoQ10 농축액 22% (실시에 1로 부터)				7.500
				총:	100.000

[0595]

표 46

CoQ10 크림 3% 노미날 활성  
부틸렌 글리콜 기제

상	구성 성분				% w/w
A	C12-C15 알킬 벤조에이트				4.000
A	세틸 알코올				2.000
A	스테아릴 알코올				1.500
A	글리세릴 스테아레이트 & PEG 100 스테아레이트				4.500
B	글리세린				2.000
B	펜틸렌 글리콜				2.250
B	부틸렌 글리콜				5.000
B	페녹시에탄올				0.476
B	카보머				40.000
B	정제수				16.000
C	소듐 락테이트				2.000
C	정제수				2.474
C	트리에탄올아민				1.300
C	락트산				0.500
D	이산화티타늄				1.000
E	CoQ10 농축액 22% (실시에 1로부터)				15.000
				총:	100.000

[0596]

표 47

**CoQ10 크림 5% 노미날 활성**  
부틸렌 글리콜 기재

상	구성 성분			% w/w
A	C12-C15 알킬 벤조에이트			3.000
A	세틸 알코올			2.000
A	스테아릴 알코올			1.500
A	글리세릴 스테아레이트 & PEG 100 스테아레이트			4.500
B	글리세린			2.000
B	펜틸렌 글리콜			2.000
B	부틸렌 글리콜			5.000
B	페녹시에탄올			0.450
B	카보머			35.000
B	정제수			14.000
C	소듐 락테이트			2.000
C	정제수			0.750
C	트리에탄올아민			1.300
C	락트산			0.500
D	이산화티타늄			1.000
E	CoQ10 농축액 22% (실시에 1로부터)			25.000
	총:			100.000

[0597]

[0598]

모든 동물은 각 제형의 동일한 용량 200mg 을 121 cm<sup>2</sup>에 7일동안 매일 혹은 단 한번을 받았다.

[0599]

적용 후, 피부 샘플을 채취해 다음과 같이 분석하였다. 피부 테스트 실험부분을 남아있는 국소적 테스트 제형을 제거하기 위해 순한 비누와 물 혼합체 (예를 들어, 1% 아이보리 비누를 물에 넣은 용액 혹은 이와 유사한 것) 를 사용하여 부드럽게 씻어내었다. 약물을 투여한 지역보다 넓게 잘라내었다면, 투여된 피부 지역을 대략적으로 윤곽을 지워지지 않는 잉크로 그려서 약물투여 지역을 표시하였다. 약 10 cm x 10 cm의 크기로 메스를 사용해 두꺼운 피부 절편(section)을 지방질층까지 포함할 수 있도록 깊이 잘라내었다. 절제 후, 피부 절편을 평편하게 펴고 두 겹의 플라스틱 랩 (SARNA WRAP.TM. 혹은 유사한 것)으로 포장하여 적절한 시간 내에 약 영하 70°C 이하에서 얼린다. 각 피부 절편은 적절하게 식별된다. (예를 들어, 동물 식별, 실험 번호, 날짜 등). 샘플은 검사 이전까지 약 영하 70°C이하에서 보관된다.

[0600]

각 피부 절편을 물이 새지 않는 플라스틱 가방에 넣고 워터베이스에서 약 30°C 내지 약 35°C에서 녹인다. 녹은 후, 표면에 남아있는 약물과 피를 제거하기 위해 각 피부 절편을 증류된 탈이온수를 이용하여 부드럽게 씻는다. 모든 피하 조직 (즉, 지방질층)을 구진성(papular) 진피층까지 메스로 제거한다.

[0601]

각 피부 절편은 약 10-25%의 표면이 반짝이는 것이 관찰될 때까지 약 10번 내지 약 20번에 걸쳐 테이프

(TRNASPORE™, 3M사 제품)로 벗겨내었다. 이를 통해 피부 각질층과 남아있는 약물을 제거하였다.

[0602] 각 피부층마다 6개의 실험부분이 잉크로 표시되었다. 표시된 지역은 1 cm<sup>2</sup> 이다.

[0603] 각 피부 절편을 물이 새지 않는 플라스틱 가방에 넣고 표피를 진피로부터 분리하는 프로세스를 시작하기 위해 약 65°C(+/- 3°C) 온도의 워터배스에 담근다. 이후에 피부층에서 실험한 부위를 편치를 이용하여 잘라내고 포셉을 이용하여 표피를 진피로부터 제거한다. 각각의 피부 절편의 무게를 측정하고 기록한다. 각 피부 절편을 메스로 갈아서 미리 표시한 튜브에 넣고 다음 분석을 위해 보관해 둔다.

[0604] 피부 샘플은 약 47시간동안 셰이커에서 이소프로판올(IPA)에 담겨 추출되고 추가 진행하기 전까지 약 영하 20°C에 보관된다. 이 후, 샘플을 약 10분간 13,500rpm으로 원심분리시키고 상청액을 2mL 앰버 유리병에 넣는다.

[0605] CoQ10을 정량은 고성능액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC-UV)를 통해 수행하였다. 간략하게 설명하면, 휴렛-팩커드 1100 시리즈 HPLC 시스템과 애질런트 1100 시리즈 LC/MSD를 사용하여 HPLC를 수행하였다. 약 65% 에탄올과 약 35% 메탄올을 포함한 용매계를 아쿠아실 C18 컬럼을 통해 약 1mL/min의 속도로 흘려보낸다. (약 3mm x 약 100mm, 5µm). 샘플 10 µl를 주입하였다. 피크 넓이를 니이트 스탠다드 (neat standard)로부터 준비한 외부표준커브 (external standard curve)를 사용하여 농도로 정량화하였다. 물에서 CoQ10이 잘 녹지 않기 때문에 IPA로 커브를 증가시켰다.

[0606] 작은 돼지 피부에서 CoQ10의 내용물에 대한 결과는 도면 1과 도면 2 및 아래 표 48과 표 49에 정리하였다. 피부 절편당 6개의 반복물들은 조직의 무게에 대해 보정하고 각 투여부분에 대한 평균을 얻기 위해 평균을 내었다.

**표 48**

평균 +/- SD 조직 중량(n=42)

공여체 #	표피 (grams)	진피 (gm)
5061873 (Male)	0.037 ± 0.012	0.682 ± 0.129
5061521 (Female)	0.026 ± 0.007	0.603 ± 0.090

[0607]



표 49

돼지 Sin(n=6/분절)에서 CoQ10의 평균: +/- SD 측정된 농도

공어체 #	성별	측면	용량 (mg)	표피 (µg/gm)	진피 (µg/gm)
5061873	남성	좌측	1.5	137.7 ± 58.2	0.72 ± 1.12
5061873	남성	좌측	3.0	188.7 ± 40.3	< LLQ
5061873	남성	좌측	5.0	163.4 ± 39.1	0.16 ± 0.39
5061873	남성	우측	1.5	519.3 ± 101.2	0.93 ± 0.81
5061873	남성	우측	3.0	315.3 ± 227.0	< LLQ
5061873	남성	우측	5.0	331.2 ± 128.7	< LLQ
5061873	남성	중앙	0	24.6 ± 11.5	< LLQ
5061521	여성	좌측	1.5	135.6 ± 39.2	< LLQ

5061521	여성	좌측	3.0	211.8 ± 60.5	< LLQ
5061521	여성	좌측	5.0	211.9 ± 67.8	< LLQ
5061521	여성	우측	1.5	118.4 ± 32.6	< LLQ
5061521	여성	우측	3.0	84.7 ± 24.6	< LLQ
5061521	여성	우측	5.0	118.1 ± 26.6	< LLQ
5061521	여성	중앙	0	25.7 ± 21.8	< LLQ

[0608]

[0609] LLQ = 품질 밸리테이션 범위의 낮은 수준 이하 (즉, 측정되지 않음)

[0610] 모든 표피세포 샘플과 선택적인 진피세포 샘플에서 측정할 수 있는 양의 CoQ10을 관찰했다고 데이터는 나타냈다.

[0611] 표피의 투여부분 모두에서 투여하지 않은 부분에 비교하여 유의적으로(p<0.001) 많은 CoQ10을 포함하고 있다는 것이 밝혀졌다.

[0612] 수컷 혹은 암컷 돼지 피부절편간에 또 각 3개의 다른 용량농도 간에 있어서도 표피세포에서는 CoQ10의 양이 유의한 차이가 없었다 (p>0.02).

[0613] 수컷과 암컷 돼지간에는, 동물의 오른쪽 측면 (1일만 투여)에 있는 투여부분에 대해서, 수컷 피부에 CoQ10 1.5%와 5%를 투여한 것에 대한 표피세포의 내용물이 암컷 피부보다 유의적으로 더 많았지만(p<0.003), CoQ10 3%를 투여한 것에 대해서는 차이가 없었다(p=0.0329). 따라서 데이터에서 보듯이, 단회투여의 경우 CoQ10의 제형을 부틸렌글라이콜을 사용했을 때보다 에톡시디글리콜을 사용했을 때 CoQ10이 유의하게 더 많이 침투할 수 있다는 것을 알 수 있었다. (1.5%와 5% 용량 투여 시 p<0.003, 3% 용량 투여시 p=0.0329)

[0614] 모든 세 용량 처리를 7일간 투여한 (왼쪽 측면) 것에 대한 수컷과 암컷 피부절편에 대한 표피세포의 수준은 통계적으로 동일하였다.

[0615] CoQ10 1.5%와 5%를 7일간 처리한 (왼쪽 측면) 수컷의 피부절편과 CoQ10 1.5%를 1일간 처리한 (오른쪽 측면) 수컷의 피부절편에서만 오직 진피세포의 내용물이 관찰되었다.

[0616] 다음과 같이 표 50에 데이터를 요약하였다.

표 50

% 농도		1.5	3	5
$\mu\text{g}$ 약물/mg 제형		15	30	50
적용된 양(mg):		200	200	200
총 적용된 약물 ( $\mu\text{g}$ )		3000	6000	10000
적용된 면적 ( $\text{cm}^2$ )		121	121	121
$\mu\text{g}$ 약물 / $\text{cm}^2$		24.79	49.59	82.64
남성 좌측 위치 (x7d)				
표피 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		3.470	6.688	7.311
% 복용량/ $\text{cm}^2$		14.0	13.5	8.8
진피 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		0.575	0	0.106
% 복용량 / $\text{cm}^2$		2.3	0.0	0.1
남성 우측 위치 (x1d)				
표피 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		18.309	8.215	10.986
% 복용량/ $\text{cm}^2$		73.8	16.6	13.3
진피 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		0.582	0	0
% 복용량 / $\text{cm}^2$		2.3	0.0	0.0

[0617]

[0618]

[0619]

표 50의 데이터를 피부의 총면적으로 추론한다면, CoQ10의 침투에 대한 내용은 아래 표 51과 같다.

표 51

	<b>총면적을 벗어나 확장된 경우:</b>		
	1.5	3	5
<b>표피</b>	<b>419.87</b>	<b>809.248</b>	<b>884.631</b>
<b>(<math>\mu\text{g}/121\text{ cm}^2</math>)</b>			
<b>% 용량</b>	<b>14.0</b>	<b>13.5</b>	<b>8.8</b>
	<b>총면적을 벗어나 확장된 경우:</b>		
	1.5	3	5
<b>표피</b>			
<b>(<math>\mu\text{g}/121\text{ cm}^2</math>)</b>	<b>2215.389</b>	<b>994.015</b>	<b>1329.306</b>
<b>% 용량</b>	<b>73.8</b>	<b>16.6</b>	<b>13.3</b>

[0620]

[0621]

CoQ10 크림 제형을 1번 적용하면 각 5%, 3%, 1.5% CoQ10 크림 제형의 적용된 용량의 12%, 17%, 70%가 전달되었다. 보통 단회투여의 경우 CoQ10의 제형을 부틸렌글라이콜을 사용했을 때보다 에톡시디글리콜을 사용했을 때 CoQ10이 유의하게 더 많이 침투할 수 있다는 것을 알 수 있었다. (1.5% 와 5% 용량 투여 시  $p < 0.003$  , 3% 용량 투여 시  $p = 0.0329$ ). 3% CoQ10을 적용하였을 때 표피세포의 내용물에 증가가 있었고 3% CoQ10용량에서와 동일한 수준의 증가가 5% CoQ10용량을 적용하였을 때 나타났다. 이것은 피부가 3% CoQ10 용량에서 포화되거나 혹은 매개체가 3% CoQ10 농도 이상의 CoQ10을 전달할 수 없다는 것을 의미한다. 압컷과 수컷 사이에 국부적으로 7일동안 적용하였을 때 피부에 도달하는 양은 동일한 것을 알 수 있다.

[0622]

에톡시디글리콜 제조법을 사용한 단회 투여 데이터에서 각 1.5%, 3%, 5% 에톡시디글리콜이 들어간 크림에 대해 평균 73.8%, 16.6%, 13.3%의 투과가 관찰되었다.

[0623]

흥미롭고 예상치 못한 발견은 시험한 CoQ10 용량 중 가장 낮은 1.5%크림에 대해 표피세포에서 발견된 CoQ10의 양이 반비례적이라는 점이다. 어떠한 이론에도 관련되지 않더라도 이것은 크림 제조법에 있어서 CoQ10과 에톡시디글리콜간의 비율이 CoQ10의 침투를 증가시키는 기능을 가지고 있거나 혹은 CoQ10과 에톡시디글리콜간의 비율과 인지질 리포솜과 관련이 있을 수 있다. CoQ10이 가장 낮은 농도로 들어 있는 크림에서 상대적으로 CoQ10과 에톡시디글리콜간의 비율이 높은 것이 표피세포에서 보다 많은 양의 CoQ10이 발견되는 이유일 수 있다.

[0624]

1.5%크림과 3%크림은 또한 성공적으로 9주간의 가속시험도 완료했고 (약 35°C와 약 50°C에서 보관), 플라스틱 병과 금속 튜브 포장으로 포장되어 5번의 열리고 녹이는 과정을 반복하는 싸이클을 통과했고, USP 미생물학적 반응검사도 통과했다. 여러 개발 배치에 대해 같은 결과를 얻을 수 있었으며 크림의 프로토타입 제형인 1.5%, 3%, 5%에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다.

[0625]

실시예 25: CoQ10 21% 농축액을 이용하여 CoQ10 크림 (1.5%, 3.0% 및 5.0%)을 형성하는 방법

[0626]

크림은 펜틸렌글라이콜 (1,2-펜탄 이올; 하이드로라이트-5, Symrise)대신 프로필렌글리콜을 사용하는 것을 제외하고는 위의 예 3에서 기술된 방법으로 생산되었다. 농축액은 아래 표 52에 나열된 재료들을 가지고 위의 실시예 1에서 기술된 방법으로 생산되었다.

표 52

배취식 - CoQ 10 농축액

상	원재료 이름	이론적 정량	
		% w/w	kg
A	포리소르페이트 80 NF	25.000	5.000
A	유비데카레논 USP	21.000	4.200
B	프로필렌 글리콜 USP	10.000	2.000
B	페녹시에탄올 NF	0.500	0.100
C	정제수 USP	35.500	7.100
C	레시틴 NF	8.000	1.600
	총	100.000	20.000

[0627]

[0628] 이 결과 나온 CoQ10 농축액 (CoQ10 21% 농축액)은 약 21중량%에 해당하는 농도의 CoQ10을 포함하고 있다.

[0629] CARBOMER 분산은 아래 표 53에 나열된 재료들을 가지고 크림을 형성하기 위해 사용된 위의 실시예 2에서 기술된 방법으로 준비되었다.

표 53

배취식 - 카보머 분산액

상	원재료 이름	이론적 정량	
		% w/w	Kg
A	페녹시에탄올 NF	0.500	0.0900
A	프로필렌 글리콜 USP	5.000	0.9000
B	정제수 USP	92.500	16.6500
C	카보머 940 NF	2.000	0.3600
	총	100.000	18.000

[0630]

[0631] CoQ10 21% 농축액의 1.5%와 3%를 가지고 있는 크림은 아래 표 54와 55에 나열된 재료들을 가지고 위의 실시예 3에서 기술한 방법과 같이 준비하였다.

표 54

배취식 - CoQ10 크림 1.5%

상	원재료 이름	이론적 정량	
		%w/w	kg
A	알킬C12-15 벤조에이트 NF	5.000	1.000
A	세틸 알코올 NF	2.000	0.400
A	스테아릴 알코올 NF	1.500	0.300
A	글리세릴 스테아레이트/PEG 100 스테아레이트	4.500	0.900
B	글리세린 USP	2.000	0.400
B	프로필렌 글리콜 USP	1.750	0.350
B	디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF	5.000	1.000
B	페녹시에탄올 NF	0.463	0.093
B	카보머 분산액 2%	50.000	10.000
B	정제수 USP	8.377	1.675
B	정제수 USP (세척용)	3.000	0.600
C	트롤라민 NF	1.300	0.260
C	락트산 USP	0.400	0.080
C	소듐 락테이트 용액 USP 60%	2.000	0.400
C	정제수 USP	4.210	0.842
D	이산화티타늄 USP	1.000	0.200
E	CoQ10 농축액 21%	7.500	1.500
	총	100.00	20.00

[0632]

표 55

배취식 - CoQ10 크림 3%

상	원재료 이름	이론적 정량	
		% w/w	kg
A	알킬C12-15 벤조에이트 NF	4.000	0.800
A	세틸 알코올 NF	2.000	0.400
A	스테아릴 알코올 NF	1.500	0.300
A	글리세릴 스테아레이트/PEG 100 스테아레이트	4.500	0.900
B	글리세린 USP	2.000	0.400
B	프로필렌 글리콜 USP	1.500	0.300
B	디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르	5.000	1.000
B	페녹시에탄올 NF	0.475	0.095
B	카보머 분산액 2%	40.000	8.000
B	정제수 USP	13.725	2.745
B	정제수 USP (세척용)	3.000	0.600
C	트롤아민 NF	1.300	0.260
C	락트산 USP	0.500	0.100
C	소듐 락테이트 용액 USP 60%	2.000	0.400
C	정제수 USP	2.500	0.500
D	이산화티타늄 USP	1.000	0.200
E	CoQ10 농축액 21%	15.000	3.000
	총	100.000	20.000

[0633]

[0634]

[0635] 실시예 26: 프로필렌 글리콜을 포함하는 CoQ10 21% 농축액을 형성하는 방법

[0636] 아래에 설명된 것과 같이 상 A와 상 B를 결합하여 CoQ10 21% 농축액 구성요소를 준비하였다. 상 A는 유비데카레논 USP (CoQ10) 21% w/w와 폴리소르베이트 80 NF 25% w/w를 포함한다. 상 B는 프로필렌 글리콜 USP 10.00%w/w, 페녹시에탄올 NF 0.50%w/w, 레시틴 NF (포스포리폰 85G) 8.00%w/w 그리고 정제수 USP 35.50%w/w를 포함한다. 모든 중량%는 전체 CoQ10 21% 농축액 구성요소의 무게에 대비한 비율이다. 비율과 더 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 56

상	상품명	INCI 명칭	%
A	리타베이트 80	폴리소르베이트 80	25.000
A	우비데카레논	유비퀴논	21.000
B	정제수	물	35.500
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	10.000
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.500
B	포스포리폰 85G	레시틴	8.000
총계			100.000

[0637]

[0638]

페녹시에탄올과 프로필렌 글리콜을 적절한 용기에 넣어서 맑게 될 때까지 섞는다. 필요한 양만큼 물을 두 번째 용기에 넣는다. (믹스탱크 1). 믹스탱크 1은 섞이는 동안에 45℃에서 55℃사이로 가열된다. 페녹시에탄올/프로필렌 글리콜 용액을 물에 추가하고 맑고 균질하게 될 때까지 섞어준다. 믹스탱크 1에서의 물의 단계의 내용물이 45℃에서 55℃사이 이면, 포스포리폰G를 넣어주고 중저의 속도로 섞어준다. 거품이 생기지 않도록 하면서 포스포리폰G가 균질하게 분산될 때까지 믹스탱크1에 있는 내용물을 섞어준다. 폴리소르베이트 89를 적절한 용기 (믹스탱크 2)에 넣고 50℃에서 60℃사이로 가열한다. 우비데카레논을 믹스탱크 2에 넣어준다. 온도를 50℃에서 60℃사이로 유지하면서 믹스탱크2는 우비데카레논이 완전히 녹을 때까지 섞어준다. 모든 우비데카레논이 녹은 후에 물의 단계를 천천히 믹스탱크2로 옮겨준다. 모든 물질들이 결합되면, 분산이 부드럽고 균질화 될 때까지 내용물을 균질화한다. 과열하지 않도록 조심하면서 온도는 50℃에서 60℃사이로 유지한다. 균질화를 중단하고 믹스탱크2의 내용물을 보관에 알맞은 용기로 옮긴다.

[0639]

실시예 27: 프로필렌 글리콜을 포함하는 CoQ10 21% 농축액의 0.5kg 배치를 형성하는 방법

[0640]

0.5kg의 CoQ10 21% 농축액은 아래 설명하는 상 A와 상 B를 혼합하여 제조되었다. A단계는 우비데카레논 USP (CoQ10) 21% w/w와 폴리소르베이트 80 NF 25% w/w를 포함한다. 상 B는 프로필렌 글리콜 USP 10%w/w, 페녹시에탄올 NF 0.5%w/w, 레시틴 NF (포스포리폰 85G) 8%w/w 그리고 정제수 USP 35.5%w/w를 포함한다. 모든 중량%는 전체 CoQ10 21% 농축액 구성요소의 무게에 대비한 비율이다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 57

상	상품명	INCI 명칭	%	(kg)
A	리타베이트 80	폴리소르베이트 80	25.000	0.1250
A	우비데카레논	유비퀴논	21.000	0.1050
B	정제수	물	35.500	0.1775
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	10.000	0.0500
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.500	0.0025
B	포스포리폰 85G	레시틴	8.000	0.0400
총계			100.000	0.5000

[0641]

[0642] 기기를 우선 깨끗이 청소하고 살균처리 하였다. 폴리소르베이트 80을 PK-2 케틀에서 직접 계량한 후 진공 케틀 PK-2를 50-55 ℃까지 가열한다. 유비데카레논 USP는 벤치탑에서 계량한 후 PK-2 그릇의 무게에 더해져 무게를 이중 검사 한다. (교반기는 끄). PK-2를 닫고 밀봉한다. 밀봉된 PK-2는 50-55℃로 온도를 유지하고 진공을 작동시킨 채 15분간 낮은 속도로 천천히 섞어준다. 다음 단계로 넘어가기 전에 모든 분말이 폴리소르베이트에 녹았는지 단계를 확인한다. PK-1에는 필요한 양만큼 물을 넣고 50-55℃까지 가열한다. 벤치탑에서 페녹시에탄올과 하이드로라이트-5를 계량하고 맑고 균질화 될 때까지 섞어주고 물을 추가하여 준 뒤 중간속도로 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 위의 물의 혼합체가 50-55℃에 도달하면, 레시틴을 추가하여 거품은 생기지 않되 분산될 때까지 중저의 속도로 섞어준다. PK-1으로부터 물의 단계를 5 갤론 용기로 이동시킨다. 물의 단계와 CoQ10 단계가 모두 50-55℃이면, 물의 단계를 CoQ10단계에 넣어주면서 중간 속도로 부드럽게 섞어준다. 모든 재료들이 PK-2로 이동되면, PK-2용기를 밀봉하고 진공을 작동시킨 채 3-5분간 7000rpm으로 실버슨 균질기를 통해 배치를 재순환시킨다. 과열하지 않도록 조심하면서 온도는 50℃에서 55℃사이로 유지한다. 균질화를 중단하고 배치를 30-35℃로 식히면서 중간속도로 부드럽게 섞어준다. 농축액은 입상 용기로 펌프를 통해 옮겨진다.

[0643] 실시예 28: 프로필렌 글리콜을 포함하는 CoQ10 21% 농축액의 20kg 배치를 준비하는 방법

[0644] CoQ10 21% 농축액의 20kg은 아래 설명하는 상 A, 상 B와 상 C를 혼합하여 제조되었다. 상 A는 유비데카레논 USP 21.00% w/w와 폴리소르베이트 80 NF 25.00% w/w를 포함한다. 상 B는 프로필렌 글리콜 USP 10.00%w/w, 페녹시에탄올 NF 0.50%w/w를 포함한다. 상 C는 레시틴 NF 8.00%w/w 그리고 정제수 USP 35.50%w/w를 포함한다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 58

상	RM 번호	원료 물질 명칭	이론적 양	
			% w/w	Gm
A	RM-002	RM-002: Polysorbate 80 NF	25.000	5.000
A	RM-010	RM-010: Ubidecarenone USP	21.000	4.200
B	RM-021	RM-021: Propylene Glycol USP	10.000	2.000
B	RM-013	RM-013: Phenoxvethanol NF	0.500	100.0
C	RM-011	RM-011: Purified Water USP	35.500	7.100
C	RM-017	RM-017: Lecithin NF	8.000	1.600
총계			100.000	20.000
PK-2를 세정하기 위한 (LEE 진공 탱크)				
	RM-019 또는 RM-020	질소 97% NF 질소 NF	q.s.	q.s.

[0645]

[0646] CoQ10 21% 농축액의 20kg 배치를 준비하기 위해서, 생산지역을 깨끗이 청소해야 한다. 모든 기기는 깨끗이 청소되어 만료/교정 안에 들어와야 한다. 페녹시에탄올 100.0gm을 계량하고 깨끗한 비이커에 넣는다.

[0647] 상 B를 준비하기 위해, 프로필렌 글리콜 2,000 gm 계량하고 깨끗한 2L SS 비이커에 넣는다. 이어서 2,000gm 정제수를 계량하여 "행구기 위한 물"이라고 라벨된 용기에 넣는다.

[0648] 2,000gm 프로필렌 글리콜이 담긴 2L SS 비이커에, 페녹시에탄올 100gm을 추가한다. 페녹시에탄올이 담겨져 있던 비이커는 "행구기 위한 물"의 1/3을 사용하여 행구져 2L 비이커에 넣는다. 2L 비이커의 내용물을 압설자 (spatula)로 맑고 균질화될 때까지 잘 섞은 뒤 상 B로 라벨한다.

[0649] 이 후에는, 레시틴 1600 gm을 계량하고 정제수 5100gm을 계량한다. PK-1을 위한 온도측정계 TIC-1과 PK-2를 위한 TIC-2를 표기한 차트를 준비한다. 정제수 5100gm을 PK-1에 넣고 50-55℃까지 가열시킨다. 교반기를 작동시키고 약간의 볼텍스(vortex)를 유지한다. 2L SS 비이커에 담겨진 상 B 용액을 천천히 PK-1으로 이동시켰다. "행구기 위한 물"의 1/3을 사용하여 SS 비이커를 행군다. 행군물은 천천히 PK-1에 넣는다. 온도는 수동으로 50-55℃로 유지한다. 레시틴 NF를 천천히 넣은 후 분산될 때까지 섞어준다. 온도는 수동으로 50-55℃로 유지하며 상 B를 PK-2로 이동할 준비가 될 때까지 계속해서 섞어준다.

[0650] 상 A를 준비하기 위해, 폴리소르베이트 80 5,000 gm을 계량하고 깨끗한 용기에 넣는 반면 유비데카레논USP 4,200 gm을 계량한다. 농축액을 혼합하기 위해서 리 진공 탱크 (PK-2), 실버슨 균질기 (P-2) alc 와우케사 펌프 (P-1)의 기기를 사용한다. 우선, PK-2의 아래쪽 밸브가 잠겨져 있는지 확인한다. 폴리소르베이트 80 5,000 gm을



액면계(sight glass) 포털을 통해 PK-2에 추가한다. 추가한 후에 PK-2에 있는 액면계를 교체한다.

[0651] PK-2 교반기를 작동시키고 폴리소르베이트 80을 PK-2에서 수동으로 50-55℃까지 가열시킨다. 폴리소르베이트 80의 온도가 50-55℃에 도달하면, 유비데카레논 USP 4,200 gm을 PK-2에 사용가능한 포털을 통해 추가한다. 추가시, 교반기 블레이드에 달라붙어 있는 유비데카레논을 압설자를 이용하여 제거한다. 첨가가 완료된 경우 투명 유리를 대체하였다. 상기 온도는 수동으로 50 내지 55℃로 하고 15분동안 혼합하였다. 유비데카레논이 폴리소르베이트 80에 녹았는지 여부를 판단하기 위해 액면계 포털을 통해 PK-2의 내용물을 검사한다. PK-1 교반기 (A-1)는 작동을 끈다.

[0652] PK-2의 가용한 포털을 통해 PK-1의 내용물 (상 B)를 PK-2에 추가한다. 남아 있는 "행구기 위한 물"을 사용하여 PK-1을 행군다. PK-2를 수동으로 50-55℃ 까지 가열시킨다. PK-2의 내용물은 5-10분간 최대 rpm으로 P-1과 P-2를 통해 재순환된다. 진공을 작동시키고 거품이 형성되는 것을 막기 위해 최대로 유지한다. 온도는 수동으로 50-55℃로 유지시킨다.

[0653] 4개의 샘플을 제거하였다: 마이크로 시험을 위한 2개의 30 gm 샘플과 물리화학적 시험을 위한 2개의 400 gm 샘플. 샘플 한 세트는 라벨하여 남겨두었다. 이후에 제품을 깨끗한 HDPE 단힌-탑 컨테이너로 이동시켰다. 배치 크기는 20,000 gm이다.

[0654] 실시예 29: CoQ10크림 1.5%를 제조하는 방법

[0655] CoQ10 크림 1.5% 조성은 상 A-상 E를 아래처럼 결합하여 준비하였다. 상 A는 C12-15 알킬 벤조에이트 NF 5.000 %w/w, 세틸알코올 NF 2.000 %w/w, 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 4.5 %w/w 그리고 스테아릴 아코올 NF 1.5 %w/w를 포함한다. 비율 및 양은 다음 표에 반영하였다.

표 59

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
A	리타올리엔트 TN	C12-15 알킬 벤조에이트	4.000
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000
A	리타 SA	스테아르 알코올	1.500
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500

[0656]

[0657] 상 B는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 5.000 %w/w, 글리세린 USP 2.000 %w/w, 프로필렌 글리콜 USP 1.750 %w/w, 페녹실에탄올 NF 0.463 %w/w, 정제수 USP 11.377 %w/w과 CARBOMER 분산 2%의 50 %w/w을 포함한다. 비율 및 양은 다음 표에 반영하였다.

표 60

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
B	리타 글리세린	글리세린	2.000
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	1.750
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.463
B	아크리타머 940, 2% 분산액	물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜, 및 카보머 940	50.000
B	정제수 USP	물	11.377

[0658]

[0659]

상 C는 젖산 USP 0.400 %w/w, 젖산나트륨 용액 USP 2.000 %w/w, 트리에탄올아민 NF 1.300 %w/w, 정제수 USP 4.210 %w/w을 포함한다. 비율 및 양은 다음 표에 반영하였다.

표 61

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
C	테아란(테아란) 99%	트리에탄올아민	1.300
C	리타락 LA USP	젖산	0.400
C	리타락 NAL	소듐 락테이트, 물	2.000
C	증류수	물	4.210

[0660]

[0661]

상 D는 이산화티타늄 USP 1.000 %w/w을 포함한다. 상 E는 CoQ10 21% 농축액 7.500 %w/w을 포함한다. 모든 중량 %는 전체 CoQ10 1.5% 크림의 구성요소의 무게에 대비한 비율이다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 반영하였다.

표 62

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
D	티타늄 디옥사이드 #3328	티타늄 디옥사이드	1.000

[0662]

표 63

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
E	CoQ10 21% 농축	들, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 레시틴, 프로필렌 글리콜, 페녹시에탄올	7.500

[0663]

[0664]

CoQ10크림 1.5%의 구성요소를 준비하기 위해 상 A 재료들을 적절한 용기에 담고 워터베이스에서 70°C 내지 80°C로 가열시킨다. 상 B 재료들 중 CARBOMER 분산을 제외하고 PK-2 케틀에 넣어서 70 내지 80°C로 가열시키며 중간속도로 부드럽게 섞어준다. 상 C 재료들을 적절한 용기에 담고 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 E CoQ10 농축액을 적절한 용기에 담고 워터베이스를 이용하여 50 내지 60°C에서 녹인면서 균질하게 만들 수 있도록 섞어준다. CARBOMER 분산을 적절한 용기 (믹스탱크)에 넣고 섞어주면서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 B 재료들을 믹스탱크 안에 있는 가열된 CARBOMER 분산에 넣어준다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 C 재료들을 믹스탱크 안에 있는 내용물에 추가하여 넣어준다. 믹스탱크는 지속적으로 섞어주고 균질화시킨다. 상 D 재료들을 믹스탱크에 넣을 때 혼합기는 끄되 균질화는 계속 이어진다. 혼합기를 키고 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 수 있도록 (색깔 확인) 섞어주고 균질화된다. 균질화를 중단하고 배치를 50 내지 60°C로 식힌다. 혼합기를 끄고 녹은 CoQ10 농축액을 믹스탱크에 추가한다. 혼합기를 다시 키고 분산이 부드럽고 균질화 될 때까지 내용물을 섞어주고 재순환 시킨다. 믹스탱크의 내용물을 45 내지 50°C로 식힌다. 포장 전까지 보관할 수 있는 적절한 용기로 식은 내용물을 옮긴다.

[0665]

실시에 30: CoQ10크림 1.5%의 0.5kg 배치를 제조하는 방법

[0666]

CoQ10 1.5% 크림 조성물은 아래 설명하는 상 A-상 E를 혼합하여 제조되었다. A단계는 C<sub>12-15</sub> 알킬 벤조에이트 NF 5.000 %w/w, 세틸알코올 NF 2.000 %w/w, 글리세릴 스테아레이트/ PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 4.5 %w/w 그리고 스테아릴 아코올 NF 1.5 %w/w를 포함한다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 반영되었다.

표 64

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
A	리타몰리엔트 TN	C12-15 알킬 벤조에이트	4.000	0.0250
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000	0.0100
A	리타 SA	스테아릴 알코올	1.500	0.0075
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500	0.0225

[0667]

[0668]

상 B는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 5.000 %w/w, 글리세린 USP 2.000 %w/w, 프로필렌 글리콜 USP 1.750 %w/w, 페녹시에탄올 NF 0.463 %w/w, 정제수 USP 11.377 %w/w과 CARBOMER 분산 2%의 50 %w/w을 포함한다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 반영되었다.

표 65

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	합량 (kg)
B	리타 글리세린	글리세린	2.000	0.0100
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	1.750	0.0088
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000	0.0250
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.463	0.0023
B	아크리타머 940, 2% 분산액	물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜, 및 카보머 940	50.000	0.2500
B	정제수 USP	물	11.377	0.0569

[0669]

[0670] 상 C는 젖산 USP 0.400 %w/w, 젖산나트륨 용액 USP 2.000 %w/w, 트리에탄올아민 NF 1.300 %w/w, 정제수 USP 4.210 %w/w를 포함한다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 반영되었다.

표 66

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	합량 (kg)
C	테아란(테아란) 99%	트리에탄올아민	1.300	0.0065
C	리타락 LA USP	젖산	0.400	0.0020
C	리타락 NAL	소듐 락테이트	2.000	0.0100
C	증류수	물	4.210	0.0211

[0671]

[0672] 상 D는 이산화티타늄 USP 1.000 %w/w를 포함한다. 상 E는 CoQ10 21% 농축액 7.500 %w/w를 포함한다. 모든 중량 %는 전체 CoQ10 1.5% 크림의 구성요소의 무게에 대비한 비율이다. 비율, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 반영되었다.

표 67

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	합량 (kg)
D	티타늄 디옥사이드 #3328	티타늄 디옥사이드	1.000	0.0050
E	CoQ10 21% 농축	물, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 레시틴, 프로필렌 글리콜, 페녹시에탄올	7.500	0.0375

[0673]

[0674] CoQ10 1.5% 크림의 구성요소를 준비하기 위해 상 A 재료들을 계량하고 워터베이스에서 70에서 75°C로 가열시킨다. 상 B 재료들을 PK-2 케틀에 넣어서 70에서 75°C로 가열시키며 중간속도로 부드럽게 섞어준다. B단계가 70-75°C에 도달하였을 때, 상 A를 70에서 75°C에서 중간속도로 부드럽게 섞어주면서 넣어준다. A단계와 상 B는 실버슨을 통해 재순환된다. 상 C 재료들을 계량하여 균질화될 때까지 섞어주고 60에서 65°C로 가열시킨다. 상 C 재료들을 PK-2 케틀에 넣어 중상의 속도로 부드럽게 섞어준다. 계속 섞어주면서 상 D를 PK-2 케틀에 있는 배치에 넣어준다. 배치를 계속 섞어주면서 10분간 실버슨을 통해 재순환 시키던가 혹은 완전히 균질화되고 퍼질 때까지 섞어준다.

[0675] 순환을 중단하고 배치를 50-55℃로 식히면서 중간속도로 천천히 섞어주었다. 상 E 준비물을 45-50℃까지 가열한 후에 배치에 넣어주었고, 균질화 될 때까지 진공을 가동한 상태에서 중간 속도로 섞어주었다. 온도는 50℃로 유지하였다. 그 후 배치를 30-35℃로 식히면서 진공을 가동한 상태에서 중저의 속도로 섞어주었다. 그 후 배치를 보관 용기로 옮긴다.

[0676] 실시예 31--20 kg 배치 CoQ10 크림 1.5%를 제조하기 위한 방법

[0677] CoQ10 1.5% 크림 20kg 배치는 아래 설명하는 상 A-상 E를 혼합하여 준비되었다. 각 상에 대한 중량%, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 68

상	RM 번호	원재료 이름	이론적 양	
			% w/w	Gm
A	RM-026	RM-026: 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드	5,000	1000.0
A	RM-003	RM-003: 세틸 알코올 NF	2,000	400.0
A	RM-005	RM-005: 스테아릴 알코올 NF	1,500	300.0
A	RM-016	RM-016: 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트	4,500	900.0
B	RM-001	RM-001: 글리세린 USP	2,000	400.0
B	RM-021	RM-021: 프로필렌 글리콜 USP	1,750	350.0
B	RM-007	RM-007: 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF	5,000	1000.0
B	RM-013	RM-013: 페녹시에탄올 NF	0,465	93.0
B	IP-003	IP-003: 카보머 분산액, 2%	50,000	10000.0
B	RM-011	RM-011: 정제수 USP	8,375	1675.0
B	RM-011	RM-011: 정제수 USP (세척용)	3,000	600.0
C	RM-009	RM-009: 트롤아민 NF	1,300	260.0
C	RM-006	RM-006: 젯산 USP	0,400	80.0
C	RM-012	RM-012: 소듐 락테이트 용액 USP 60%	2,000	400.0
C	RM-011	RM-011: 정제수 USP	4,210	842.0
D	RM-008	RM-008: 티타늄 디옥사이드 USP	1,000	200.0
E	IP-004	IP-004: CoQ10 농축, 21%	7,500	1500.0
		총	100.00	20000.0
PK-2 배출용(진공 탱크)				
	RM-019 또는 RM-020	질소 97% NF 또는 질소 NF	q.s.	q.s.

[0678]

[0679] 화학물질들을 흘리지 않도록 조심히 계량하였다. 이산화티타늄 (상 D) 200gm 을 계량하였다. 정제수 600gm을 계량한 후 "행구기 위한 물"이라고 표시하였다. (상 B)

[0680] 상 A를 준비하기 위해서, 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드 1000gm과 세틸알코올 NF 400gm, 스테아릴 아코올 NF 300gm, 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트의 혼합물 900 gm을 계량하였다. 이렇게 사전에 계량된 상 A 재료들을 4L SS 비어커에 넣고 상 A라고 표시하였다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 A 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.

[0681] 상 B를 준비하기 위해, 실시예 11 A에서처럼 카보머 분산 2% 10,000 gm을 계량한다. 글리세린 USP 400gm, 프로필렌 글리콜 350gm, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 1000gm, 페녹시에탄올 NF 93gm을 계량한다. 정제수 1675gm을 계량하여 용기에 넣고 "상 B를 위한 정제수"라고 표기한다. 이렇게 사전에 계량된 상 B 재료들을 10L SS 비어커에 넣고 상 A라고 표시하였다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 B

용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 B 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.

- [0682] 상 C를 준비하기 위해, 트리에탄올아민 NF 260gm, 젖산나트륨 용액 USP 400gm, 60%, 정제수 842gm ("상 C를 위한 정제수"로 표시) 그리고 젖산 USP 80gm을 계량하였다. 이렇게 사전에 계량된 상 C 재료들을 2L SS 비이커에 다음과 같은 순서로 놓았다: (1) 트리에탄올아민 NF 260gm (2) 젖산나트륨 용액 USP 400gm, 60% (3) C단계를 위한 정제수 842gm (4) 젖산 USP 80gm. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 C 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 C 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.
- [0683] 상 E를 준비하기 위해, CoQ10 21% 농축액 1500gm을 계량하여 용기에 넣고, 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.
- [0684] CoQ10 1.5% 크립 20kg 배치를 준비하기 위해서는 2개의 워터베스가 필요하다. 상 A 비이커를 70-75°C에 맞춰진 워터베스에 넣고 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 C 비이커를 60-65°C에 맞춰진 워터베스에 넣고 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 유사하게, 상 E 비이커를 50-55°C에 맞춰진 워터베스에 넣는다. 상 E 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다.
- [0685] 추가적으로 필요한 기기에는 워터베스 (E-1), 리 진공 탱크 (PK-2), 와우케사 펌프 (P-1) 그리고 실버슨 균질기를 위한 고속 쉬어스크린용 사각구멍이 있다.
- [0686] 우선 PK-2의 아래쪽 밸브가 잠겨져 있는지 확인하고 PK-2가 알맞게 밀봉되었는지 확인한다. 액면계를 PK-2에서 제거한다. 사전에 계량된 카보머 분산 2% 10,000 gm을 액면계 포털을 통해 PK-2에 넣는다. 카보머 분산 2%가 담겨있던 용기 벽에 남지 않도록 압설자를 이용하여 이동시킨다. PK-2를 위한 TIC-2 (온도 측정계)를 가동시키고 올바르게 작동하는지 확인한다. PK-2 (A-2)에 대한 교반기를 작동시키고 PK-2에 있는 카보머 분산 2%를 스팀자켓을 이용해 70-80°C까지 가열시킨다. 진공전원을 끈다. PK-2에서 액면계를 제거하고 SS 비이커에 담겨진 상 B를 액면계 포털을 통해 PK-2로 천천히 옮긴다. "상 B 행구기 위한 물"을 사용하여 B단계 용기를 행군다. 행군 물은 액면계 포털을 통해 PK-2에 넣는다. 상 A를 PK-2에 천천히 넣는다. SS 비이커 벽에 남지 않도록 압설자를 이용하여 이동시킨다. 상 A는 PK-2로 이동될 때 온도가 반드시 70-80°C 여야만 한다. PK-2의 아래쪽 밸브를 연다. P-1(와우케사 펌프)와 P-2(실버슨 균질기)를 가동시키고 PK-2 (진공탱크)의 내용물을 균질화시킨다. 상 C를 가능한 포털을 통해 PK-2에 추가시킨다. 상 C는 PK-2로 이동될 때 온도가 반드시 70-80°C 여야만 한다. 5분 이상 균질화되어야 하고 이후에 A-2(교반기) 작동을 멈춘다. 사전에 계량된 상 D의 이산화티타늄 200.0gm을 PK-2에 눈이 100개인 채를 통해 이동시킨다. 압설자를 사용하여 PK-2의 블레이드에 붙어있는 이산화티타늄을 떼어낸다.
- [0687] 액면계를 교체하고 A-2를 다시 가동시킨다. P-1(와우케사 펌프)와 P-2를 통해 재순환되면서 내용물을 계속해서 섞어준다. 내용물을 10분간 균질화시키거나 혹은 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 때까지 (색깔 확인) 계속 섞어준다. 10분 뒤 P-2를 정지한다. PK-2의 내용물은 50-60°C까지 식혀진다. 액면계를 제거하고 녹은 CoQ10 21% 농축액 (실시에 7A에서 보여진 상 E)을 천천히 PK-2에 넣는다. 액면계는 다시 교체한다.
- [0688] PK-2의 내용물을 균질화될 때까지 섞고 P-1을 통해 재순환시켰다. 온도는 50-60°C로 유지하였다. 질소 NF 공급이 시작되고 이어서 C-2 (진공펌프)가 가동되었다. 제품에 거품이 생기지 않도록 하는 것이 가장 좋다는 것을 명심해야 한다. 배치를 45-50°C로 식히고 진공과 질소 NF공급 모두를 가동시켰다. 제품이 낮은 온도로 식혀졌을 때, C-2의 전원을 끄고 질소 NF에 대한 진공도 함께 중단시킨다. 단, 질소 NF 공급은 계속 켜고 있다. 샘플을 채취하거나 제품을 포장하기 이전에 바깥쪽 밸브는 제거된다. 제품은 사전에 계량되고 깨끗한 HDPE 단힌-담 컨테이너로 이동시켰다. A-2, P-1 그리고 질소 NF 공급 모두 끄고 배치가 완료되면 TIC-2 차트에 표시한다.
- [0689] 2개의 30gm (최소) 샘플을 마이크로 시험을 위해 제거하고 2개의 400gm (최소) 샘플을 물리화학적 시험을 위해 제거한다. 샘플 한 세트는 라벨하여 남겨두었다. 채워진 용기는 무게를 측정하였다. 배치 크기는 20,000 gm이다.
- [0690] 실시에 32: 카보머 분산 2%의 18kg 배치를 준비하는 방법
- [0691] 카보머 분산 2% 조성의 18kg 배치는 상 A-상 C를 아래처럼 결합하여 준비하였다. A단계는 프로필렌 글리콜 USP 0.50 %w/w와 페녹시알코올 NF 5.00 %w/w를 포함한다. B단계는 정제수 USP 92.50 %w/w를 포함하고, C단계는 카보머 940 NF 2.00 %w/w를 포함한다. 모든 중량%는 전체 CoQ10 크립 2.0% 구성요소의 무게에 대비한 비율이다.

성분의 % 및 양은 다음 표에 설명되어 있다.

표 69

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
A	페녹시에탄올	페녹시에탄올	5.00	0.9
A	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	0.500	0.09
B	정제수, USP	정제수	92.500	16.65
C	아크리타머 940	카보머 940 NF	2.000	0.3600
	총		100.000	18.00

[0692]

[0693]

적절한 용기에, 상 A 재료들을 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 두 번째 용기 (믹스 탱크)에 상 B의 정제수를 넣는다. 일정량의 정제수 ("행구기 위한 물")를 상 A 용기를 행구기 위해 남겨둔다. 두 번째 용기에 담겨진 정제수를 60 내지 65°C로 가열한다. 상 A 재료들을 상 B 정제수에 추가하고, 상 A 용기를 "행구기 위한 물"을 사용하여 행군다. 상 A 용기에 들어있던 내용물을 맑고 균질화될 때까지 섞는다. 상 C의 카보머 940을 천천히 믹스 탱크에 넣으면서 (간간히 뿌려 섞다) 섞는 속도를 증가시킨다. 모든 분말이 잘 분산되고 "은점"이 존재하지 않을 때까지 계속 섞는다. 온도는 60 내지 65°C로 유지한다. 이후에 보관하기 알맞은 용기로 내용물을 옮긴다.

[0694]

실시예 33: 카보머 분산 2%의 3kg 배치를 준비하는 방법

[0695]

카보머 분산 2% 조성의 3kg 배치는 상 A-상 C를 아래처럼 결합하여 준비하였다. A단계는 프로필렌 글리콜 USP 0.50 %w/w와 페녹시에탄올 NF 5.00 %w/w를 포함한다. B단계는 정제수 USP 92.50 %w/w를 포함하고, C단계는 카보머 940 NF 2.00 %w/w를 포함한다. 모든 중량%는 전체 CoQ10 크립 2.0% 구성요소의 무게에 대비한 비율이다. %, 양 및 추가의 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 70

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
A	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.500	0.0150
A	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	5.000	0.1500
B	정제수, USP	물	92.500	2.7750
C	아크리타머 940	카보머 940	2.000	0.0600
	총		100.000	3.0000

[0696]

[0697]

모든 기기를 깨끗이 씻고 살균한다. 벤치탑에서 상 A 재료들을 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 필요한 정제수를 계량하여 케틀PK-1에 넣는다 (베셀 단계). PK-1에 있는 정제수는 뜨거운 물/스팀 자켓을 이용하여 60-65°C까지 가열된다. 상 A를 상 B 물에 넣으면서 맑고 균질화될 때까지 중간속도로 섞어준다. 상 A 용기는 60-65°C의 온도로 유지되면서 물로 행구진다. 모든 분말이 잘 분산되고 "은점"이 존재하지 않을 때까지 중상의 속도로 계속 섞는다. 마이크로 품질, pH, 특정 중력 및 점도에 대한 시험을 위한 샘플을 채취한다. pH, 특정 중력 및 점도가 모두 규격안에 들어오는 배치는 깨끗하고 살균된 5갤론 단힌-탑 대형유리병으로 옮긴다.

[0698]

실시예 34: 카보머 분산 2%의 18kg 배치를 준비하는 방법

[0699]

카보머 분산 2% 조성의 18kg 배치는 상 A-상 C를 아래처럼 결합하여 준비하였다. A단계는 프로필렌 글리콜 USP 0.50 %w/w와 페녹시에탄올 NF 5.00 %w/w, 정제수 USP 92.50 %w/w, 카보머 940 NF 2.00 %w/w를 포함한다.

표 71

상	RM 번호	원재료 이름	이론적 양	
			% w/w	GMS
A	RM-013	페녹시에탄올 NF	0.500	90.0
A	RM-021	프로필렌 글리콜 USP	5.000	900
B	RM-011	정제수 USP	92.500	16,650
C	RM-004	카보머 940 NF	2.000	360
		총	100.000	18,000

[0700]

[0701]

[0702]

[0703]

[0704]

[0705]

[0706]

[0707]

[0708]

[0709]

이 배치를 준비하기 위해서 사토리우스 전자저울, 메틀러 전자저울, 차트 기록계, 리 진공 탱크 및 2L 스테인레스 강(SS) 비이커 기기들이 필요하다.

재료들을 계량하기에 앞서, 생산지역을 깨끗이 청소해야 한다. 모든 기기는 깨끗이 청소되어 만료/교정 안에 들어와야 한다. 저울을 교정한 것을 확인하고 기록한다. 무게재는 용기는 칭량통(weighing pan)의 유출을 피하기 위해 무게를 달아본다. 먼저 정제수 1650gm을 계량하고 "행구는 물"이라 표시된 용기에 넣는다. 추가적인 정제수 15,000gm을 계량한다. 카보머940NF 360gm을 역시 계량한다.

상 A는 페녹시에탄올 90gm을 계량하여 비이커에 넣어서 준비한다. 프로필렌 글리콜 USP 900gm을 계량하여 2L SS 비이커에 넣는다. 사전에 계량된 페녹시에탄올 NF를 프로필렌 글리콜이 담겨있는 2L SS 비이커에 넣는다. 비이커에 남아있는 페녹시에탄올은 "행구는 물"의 1/3을 사용하여 행군다. 용기는 상 A라고 라벨한다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다.

상 A는 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 압설자는 "행구는 물"의 1/3로 씻으면서 제거한다.

상 A를 준비한 후에, 리 단계 탱크 (PK-1)을 이용하여 분산을 혼합하였다. TIC-1 (온도 측정계)에 적절히 표기한 차트를 넣는다. TIC-1 (허니웰 온도 측정계)를 작동시키고 제대로 작동하는지 확인한다. PK-1의 아래쪽 벨브가 잠겨져 있는지 확인하고 사전에 계량한 정제수 USP를 PK-1에 넣는다. SS 비이커는 남아있는 "행구는 물"로 씻어서 PK-1에 넣는다.

교반기를 중간정도 속도로 작동시키고 PK-1의 내용물을 뜨거운 물/스팀자켓을 이용하여 60-65°C로 가열시킨다. 온도의 수용가능한 범위는 55-70°C사이이다. 교반기는 튀기지 않을 수준에서 최대 속도로 설정한다. 사전에 계량한 카보머940NF를 최소 15분에서 20분 사이에 걸쳐 PK-1안으로 눈이 50개인 채를 통해 이동시켰다. 목표 온도는 60-65°C이지만, 수용가능한 온도의 범위는 55-70°C사이이다. 이후에 교반기를 빠른 속도로 작동시킨다. 빠른 속도로 최소 1시간 이상 계속 섞어주어 모든 분말이 잘 분산되고 "은점"이 존재하지 않을 때까지 섞어준다. 소용돌이 가상자리에 남아 있는 분말을 분산시키기 위해 압설자를 사용했다.

2개의 30gm 샘플을 마이크로 시험을 위해 제거하고 2개의 400gm 샘플을 물리화학적 시험을 위해 제거한다. 샘플한 세트는 라벨하여 남겨두었다. 제품은 깨끗한 HDPE 닫힌-탑 컨테이너로 이동되었다. 배치 크기는 18,000 gm이다.

실시예 35: CoQ10 21% 농축물과 알킬 벤조에이트를 포함하는 CoQ10 크림 3%를 제조하는 방법

CoQ10 3.0% 크림 조성물은 아래 설명하는 단계들을 결합하여 준비되었다. A단계는 C12-15 알킬 벤조에이트 NF 4.00 %w/w, 세틸알코올 NF 2.00 %w/w, 글리세릴 스테아레이트/ PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 4.50 %w/w 그리고 스테아릴 아코올 NF 1.5 %w/w를 포함한다. %, 양 및 더 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.



표 72

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
A	리타몰리엔트 TN	C12-15 알킬 벤조에이트	4.000
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000
A	리타 SA	스테아릴 알코올	1.500
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500

[0710]

[0711] 상 B는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 5.00 %w/w, 글리세린 USP 2.00 %w/w, 프로필렌 글리콜 USP 1.50 %w/w, 페녹시에탄올 NF 0.475 %w/w, 정제수 USP 16.725 %w/w과 카보머 분산 2%의 50 %w/w을 포함한다. 성분의 % 및 양은 다음 표에 설명되어 있다.

표 73

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
B	리타글리세린	글리세린	2.000
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	1.500
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.475
B	아크리머 940, 2% 분산액	물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜, 카보머 940	40.000
B	정제수, USP	물	16.725

[0712]

[0713] 상 C는 젯산 USP 0.50 %w/w, 젯산나트륨 용액 USP 2.00 %w/w, 트리에탄올아민 NF 1.30 %w/w, 정제수 USP 2.50 %w/w을 포함한다. 성분의 % 및 양은 다음 표에 설명되어 있다.

표 74

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
C	테아란 99%	트리에탄올아민	1.300
C	리타락 LA	젯산	0.500
C	리타락 NAL	소듐 락테이트, 물	2.000
C	정제수, USP	물	2.500

[0714]

[0715] 상 D는 이산화티타늄 USP 1.00 %w/w을 포함한다. 상 E는 CoQ10 21% 농축액 15.00 %w/w을 포함한다. 비율과 재료의 양에 대한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 75

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율
D	티타늄 디옥사이드 #3328	티타늄 디옥사이드	1.000
E	CoQ10 21% 농축	프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 80, 유비퀴논, 페녹시에탄올	15

[0716]

[0717] 모든 중량 %는 전체 CoQ10 3.0% 크림의 구성요소의 중량에 대비한 비율이다.

[0718] 상 A 재료들을 적절한 용기에 넣어 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 B 재료들 중 카보머 분산을 제외하고 적절한 용기에 넣어서 섞어준다. 상 C 재료들을 적절한 용기에 담고 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 E CoQ10 농축액을 적절한 용기에 담고 워터베이스를 이용하여 50 내지 60°C에서 녹인다. 재료들이 균질하게 되도록 섞어준다. 카보머 분산을 적절한 용기 (믹스탱크)에 넣고 섞어주면서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 B 재료들을 믹스탱크 안에 내용물에 넣어준다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 C 재료들을 믹스탱크 안에 있는 내용물에 추가하여 넣어준다. 믹스탱크는 지속적으로 섞어주고 균질화시킨다. 혼합기는 끄되 균질화는 계속 이어진다. 상 D의 이산화티타늄을 믹스탱크에 넣으면서 균질화는 계속한다. 혼합기를 다시 켜고 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 수 있도록 (색깔 확인) 섞어주고 균질화시킨다. 균질화를 중단하고 배치를 50 내지 60°C로 식힌다. 혼합기를 끄고 녹은 CoQ10 농축액을 믹스탱크에 추가한다. 혼합기를 다시 키고 분산이 부드럽고 균질화 될 때까지 내용물을 섞어주고 재순환 시킨다. 믹스탱크의 내용물을 45 내지 50°C로 식힌다. 상자를 열 때까지 보관할 수 있는 적절한 용기로 식은 내용물을 옮긴다.

[0719] 실시예 36: CoQ10 21% 농축물과 알킬 벤조에이트를 포함하는 CoQ10 크림 3%의 0.5kg 배치를 준비하는 방법

[0720] CoQ10 3.0% 크림 조성물의 0.5kg 배치는 아래 설명하는 단계들을 결합하여 준비되었다. A단계는 C12-15 알킬 벤조에이트 NF 4.00 %w/w, 세틸알코올 NF 2.00 %w/w, 글리세릴 스테아레이트/ PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 4.50 %w/w 그리고 스테아릴 아코올 NF 1.5 %w/w를 포함한다. %와 양은 다음 표에 설명되어 있다.

표 76

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
A	카프릴릭	C12-15 알킬 벤조에이트	4.000	0.0200
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000	0.0100
A	리타 SA	스테아릴 알코올	1.500	0.0075
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 STEARATE	4.500	0.0225

[0721]

[0722] 상 B는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 5.00 %w/w, 글리세린 USP 2.00 %w/w, 프로필렌 글리콜 USP 1.50 %w/w, 페녹시에탄올 NF 0.475 %w/w, 정제수 USP 16.725 %w/w과 카보머 분산 2%의 50 %w/w을 포함한다. %와 양은 상응하는 상에서 다음 표에 기재되어 있다.

표 77

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
B	리타글리세린	글리세린	2.000	0.0100
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	1.500	0.0075
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000	0.0250
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.475	0.0024
B	아크리머 940, 2% 분산액	물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜, 카보머 940	40.000	0.2000
B	정제수, USP	물	16.725	0.0836

[0723]

[0724] 상 C는 젖산 USP 0.50 %w/w, 젖산나트륨 용액 USP 2.00 %w/w, 트리에탄올아민 NF 1.30 %w/w, 정제수 USP 2.50 %w/w을 포함한다. %, 양 및 더 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 78

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
C	테아란 99%	트리에탄올아민	1.300	0.0065
C	리타락 LA	젖산	0.500	0.0025
C	리타락 NAL	소듐 락테이트, 물	2.000	0.0100
C	정제수, USP	물	2.500	0.0125

[0725]

[0726] 상 D는 이산화티타늄 USP 1.00 %w/w을 포함한다. 상 E는 CoQ10 21% 농축액 15.00 %w/w을 포함한다. %, 양 및 추가의 상세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 79

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
D	티타늄 디옥사이드, #3328	티타늄 디옥사이드	1.000	0.0050
E	CoQ10 21% 농축	프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 80, 물, 유비퀴논, 레시틴, 페녹시에탄올	15.000	0.0750

[0727]

[0728] 모든 중량%는 전체 CoQ10 3.0% 크림의 구성요소의 중량에 대비한 비율이다.

[0729] 상 A 재료들을 적절한 용기에 넣어 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 B 재료들 중 카보머 분산을 제외하고 적절한 용기에 넣어서 섞어준다. 상 C 재료들을 적절한 용기에 담고 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 E CoQ10 농축액을 적절한 용기에 담고 워터베이스를 이용하여 50 내지 60°C에서 녹인다. 재료들이 균질하게 되도록 섞어준다. 카보머 분산을 적절한 용기 (믹스탱크)에 넣고 섞어주면서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 B 재료들을 믹스탱크 안에 내용물에 넣어준다. 내용물은 지

속적으로 섞어주고 균질화시킨다. 혼합기는 끄되 균질화는 계속 이어진다. 상 D의 이산화티타늄을 믹스탱크에 넣으면서 균질화는 계속한다. 혼합기를 다시 켜고 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 수 있도록 (색깔 확인) 섞어주고 균질화시킨다. 균질화를 중단하고 배치를 50 내지 60℃로 식힌다. 혼합기를 끄고 녹은 CoQ10 농축액을 믹스탱크에 추가한다. 혼합기를 다시 키고 분산이 부드럽고 균질화 될 때까지 내용물을 섞어주고 재순환시킨다. 믹스탱크의 내용물을 45 내지 50℃로 식힌다. 상자를 열 때까지 보관할 수 있는 적절한 용기로 식은 내용물을 옮긴다.

[0730] 실시예 37: CoQ10 21% 농축물과 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드를 포함하는 CoQ10 크림 3%의 0.5kg 배치를 준비하는 방법

[0731] CoQ10 3.0% 크림 조성물의 0.5kg 배치는 아래 설명하는 단계들을 결합하여 준비되었다. A단계는 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드 4.00 %w/w, 세틸알코올 NF 2.00 %w/w, 글리세릴 스테아레이트/ PEG-100 스테아레이트의 혼합물은 4.50 %w/w 그리고 스테아릴 알코올 NF 1.5 %w/w를 포함한다. %와 양은 다음 표에 설명되어 있다.

표 80

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	합량 (kg)
A	카프릴릭	카프릭 트리글리세리드	4.000	0.0200
A	리타 CA	세틸 알코올	2.000	0.0100
A	리타 SA	스테아릴 알코올	1.500	0.0075
A	리타프로 165	글리세릴 스테아레이트 및 PEG-100 스테아레이트	4.500	0.0225

[0732]

[0733] 상 B는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 5.00 %w/w, 글리세린 USP 2.00 %w/w, 프로필렌 글리콜 USP 1.50 %w/w, 페녹시에탄올 NF 0.475 %w/w, 정제수 USP 16.725 %w/w과 카보머 분산 2%의 40 %w/w을 포함한다. 비율과 더 자세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 81

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	합량 (kg)
B	리타 글리세린	글리세린	2.000	0.0100
B	프로필렌 글리콜	프로필렌 글리콜	1.500	0.0075
B	트랜스큐틀 P	에톡시디글리콜	5.000	0.0250
B	페녹시에탄올	페녹시에탄올	0.475	0.0024
B	아크리타머 940, 2% 분산으로	물, 페녹시에탄올, 프로필렌 글리콜, 카보머 940	40.000	0.2000
B	정제수, USP	물	16.725	0.0836

[0734]

[0735] 상 C는 젯산 USP 0.50 %w/w, 젯산나트륨 용액 USP 2.00 %w/w, 트리에탄올아민 NF 1.30 %w/w, 정제수 USP 2.50 %w/w을 포함한다. %, 양 및 추가의 상세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 82

상	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
C	테이란 99%	트리에탄올아민	1.300	0.0065
C	리타락 LA	젯산	0.500	0.0025
C	리타락 NAL	소듐 락테이트, 물	2.000	0.0100
C	정제수, USP	물	2.500	0.0125

[0736]

[0737] 상 D는 이산화티타늄 USP 1.00 %w/w을 포함하는 한편, 상 E는 CoQ10 21% 농축액 15.00 %w/w을 포함한다. %, 양 및 추가의 상세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 83

상s	상표 이름	CTFA 이름	백분율	함량 (kg)
D	티타늄 디옥사이드 #3328	티타늄 디옥사이드	1.000	0.0050
E	CoQ10 21% 농축	프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 80, 물, 유비쿠린, 레시틴, 페녹시에탄올	15.000	0.0750

[0738]

[0739] 모든 중량%는 전체 CoQ10 3.0% 크림의 구성요소의 중량에 대비한 비율이다.

[0740] 상 A 재료들을 적절한 용기에 넣어 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 B 재료들 중 카보머 분산을 제외하고 적절한 용기에 넣어서 섞어준다. 상 C 재료들을 적절한 용기에 담고 워터베이스에서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 상 E CoQ10 농축액을 적절한 용기에 담고 워터베이스를 이용하여 50 내지 60°C에서 녹인다. 재료들이 균질하게 되도록 섞어준다. 카보머 분산을 적절한 용기 (믹스탱크)에 넣고 섞어주면서 70 내지 80°C로 가열시킨다. 계속 온도를 유지해가며 섞어주면서 상 B 재료들을 믹스탱크 안에 내용물에 넣어준다. 내용물은 지속적으로 섞어주고 균질화시킨다. 혼합기는 끄되 균질화는 계속 이어진다. 상 D의 이산화티타늄을 믹스탱크에 넣으면서 균질화는 계속한다. 혼합기를 다시 켜고 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 수 있도록 (색깔 확인) 섞어주고 균질화시킨다. 균질화를 중단하고 배치를 50 내지 60°C로 식힌다. 혼합기를 끄고 녹은 CoQ10 농축액을 믹스탱크에 추가한다. 혼합기를 다시 켜고 분산이 부드럽고 균질화 될 때까지 내용물을 섞어주고 재순환시킨다. 믹스탱크의 내용물을 45 내지 50°C로 식힌다. 상자를 열 때까지 보관할 수 있는 적절한 용기로 식은 내용물을 옮긴다.

[0741] 실시예 38: CoQ10 21% 농축물과 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드를 포함하는 CoQ10 크림 3%의 20kg 배치를 준비하는 방법

[0742] CoQ10 3.0% 크림 조성물의 20kg 배치는 아래 설명하는 A-E 상들을 결합하여 준비되었다. 중량%, 양 및 추가의 상세한 내용은 다음 표에 설명되어 있다.

표 84

상	RM 번호	원재료 이름	이론적 양	
			% w/w	Gm
A	RM-026	RM-026: 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드	4.000	800.0
A	RM-003	RM-003: 세틸 알코올 NF	2.000	400.0
A	RM-005	RM-005: 스테아릴 알코올 NF	1.500	300.0
A	RM-016	RM-016: 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트	4.500	900.0
B	RM-001	RM-001: 글리세린 USP	2.000	400.0
B	RM-021	RM-021: 프로필렌 글리콜 USP	1.500	300.0
B	RM-007	RM-007: 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF	5.000	1000.0
B	RM-013	RM-013: 페녹시에탄올 NF	0.475	95.0
B	IP-003	IP-003: 카보머 분산액, 2%	40.000	8000.0
B	RM-011	RM-011: 정제수 USP	13.725	2745.0
B	RM-011	RM-011: 정제수 USP (세척용)	3.000	600.0
C	RM-009	RM-009: 트리에탄올아민 NF	1.300	260.0
C	RM-006	RM-006: 젯산 USP	0.500	100.0
C	RM-012	RM-012: 소듐 락테이트 용액 USP, 60%	2.000	400.0
C	RM-011	RM-011: 정제수 USP	2.500	500.0
D	RM-008	RM-008: 티타늄 디옥사이드 USP	1.000	200.0
E	IP-004	IP-004: CoQ10 농축, 21%	15.000	3000.0
		총	100.00	20000.0
PK-2 배출용(진공 탱크)				
	RM-019 또는 RM-020	질소 97% NF 또는 질소 NF	q.s.	q.s.

[0743]

[0744]

CoQ10 3.0% 크립 조성물의 20kg 배치를 준비하기 위해 아래와 같은 절차를 진행하였다. 화학물질들을 계량하기에 앞서, 생산장소와 기기들을 깨끗하게 준비하였다. 첫 번째 화학성분들을 칭량용 팬에 흘리지 않도록 조심히 계량하였다.

[0745]

우선 이산화티타늄 USP (상 D) 200gm 을 계량하였다. 정제수 600gm("상 B 세정용 물- "이라고 표시)을 칭량하였다.

[0746]

상 A를 준비하기 위해서, 카프릭/카프릴릭 트리글리세라이드 800gm과 세틸알코올 NF 400gm, 스테아릴 아코올 NF 300gm, 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트의 혼합물 900 gm을 계량하였다. 이렇게 사전에 계량된 상 A 재료들을 4L SS 비이커에 넣고 상 A라고 표시하였다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 A 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다

[0747]

상 B를 준비하기 위해, 카보머 분산 2% 8,000 gm, 글리세린 USP 400gm, 프로필렌 글리콜 300gm, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 NF 1,000gm, 페녹시에탄올 NF 95gm을 계량한다. 정제수 2745gm을("상 B를 위한 정제수"라고 표기) 계량한다. 이렇게 사전에 계량된 상 B 재료들을 10L SS 비이커에 넣는다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 B 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 B 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.

[0748]

상 C를 준비하기 위해, 트리에탄올아민 NF 260gm, 젯산나트륨 용액 USP 400gm, 60%, 정제수 500gm ("상 C를 위한 정제수"로 표시) 그리고 젯산 USP 100gm을 계량하였다. 상 C 재료들을 2L SS 비이커에 다음과 같은 순서로 넣었다: (1) 트리에탄올아민 NF 260gm (2) 젯산나트륨 용액 USP 400gm, 60% (3) C단계를 위한 정제수 500gm (4) 젯산 USP 1010gm. 이 용기를 상 C라고 라벨한다. 이 혼합체는 반드시 24시간 이내에 사용해야 함을 주의해야 한다. 상 C 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 C 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.

- [0749] 상 E를 준비하기 위해, CoQ10 21% 농축액 3,000gm을 계량하여 상 E라고 라벨한 용기에 넣는다. 상 E 용기에 뚜껑을 덮고 나중에 사용하기 위해 옆으로 놔둔다.
- [0750] CoQ10 3% 크림 혼합하기 위해서는 상 A, C 및 E를 가열하기 위해 2개의 워터배스가 사용된다. 우선 상 A 비이커를 70-75°C에 맞춰진 워터배스에 넣고 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 C 비이커를 60-65°C에 맞춰진 워터배스에 넣고 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다. 상 E 비이커를 50-55°C에 맞춰진 워터배스에 넣는다. 상 E 용기에 들어있는 내용물을 압설자를 이용하여 맑고 균질화될 때까지 섞어준다.
- [0751] 크림을 혼합하기 위해서, 워터배스 (E-1), 리 진공 탱크 (PK-2), 와우케사 펌프 (P-1) 그리고 실버슨 균질기를 위한 고속 쉬어스크린용 사각구멍이 사용된다.
- [0752] 우선 PK-2의 아래쪽 밸브가 잠겨져 있는지 확인하고 PK-2가 알맞게 밀봉되었는지 확인한다. 액면계를 PK-2에서 제거하고 사전에 계량된 카보머 분산 2.0% 10,000 gm을 액면계 포털을 통해 PK-2에 넣는다. 카보머 분산 2.0%가 담겨있던 용기 벽에 남지 않도록 압설자를 이용하여 이동시킨다. PK-2를 위한 TIC-2 (온도 측정계)를 가동시키고 올바르게 작동하는지 확인한다.
- [0753] PK-2에 대한 교반기(A-2)를 작동시키고 PK-2에 있는 카보머 분산 2%를 스팀자켓을 이용해 70-80°C까지 가열시킨다. PK-2에서 액면계를 제거하고 SS 비이커에 담겨진 상 B를 액면계 포털을 통해 PK-2로 천천히 옮긴다. "상 B 행구기 위한 물" 을 사용하여 B단계 용기를 행군다. 행군물은 액면계 포털을 통해 PK-2에 넣는다.
- [0754] 상 A를 PK-2에 천천히 넣는다. SS 비이커 벽에 남지 않도록 압설자를 이용하여 이동시킨다. 상 A는 PK-2로 이동될 때 온도가 반드시 70-80°C여야만 한다.
- [0755] PK-2의 아래쪽 밸브를 연다. P-1 펌프와 P-2(실버슨 균질기)를 가동시킨다. PK-2 (진공탱크)의 내용물을 균질화시킨다.
- [0756] 상 C를 가능한 포털을 통해 PK-2에 추가시킨다. 상 C는 PK-2로 이동될 때 온도가 반드시 70-80°C여야만 한다. 5분 이상 균질화되어야 하고 이후에 A-2 교반기 작동을 멈춘다. 사전에 계량된 이산화티타늄 200gm을 PK-2에 눈이 100개인 채를 통해 이동시킨다. 압설자를 사용하여 PK-2의 블레이드에 붙어있는 이산화티타늄을 떼어낸다.
- [0757] 액면계를 교체하고 A-2를 다시 가동시킨다. P-1와 P-2를 통해 재순환되면서 내용물을 계속해서 섞어준다. 내용물을 10분간 균질화시키거나 혹은 재료들이 완전히 균질화되고 퍼질 때까지 계속 섞어준다. 10분 뒤 P-2를 정지한다. PK-2의 내용물은 50-60°C까지 식혀진다. 액면계를 제거하고 상 E의 녹은 CoQ10 21% 농축액을 천천히 PK-2에 넣는다. 액면계는 다시 교체한다.
- [0758] PK-2의 내용물을 균질화될 때까지 A-2를 사용해 섞는다. 온도는 50-60°C로 유지하였고 P-1을 통해 재순환시켰다. 질소 NF 공급이 시작되고 이어서 C-2 진공펌프가 가동되었다. 제품에 거품이 생기지 않도록 하는 것이 가장 좋다는 것을 명심해야 한다. 배치를 45-50°C로 식히고 진공과 질소 NF공급 모두를 가동시켰다. 제품이 낮은 온도로 식혀졌을 때, C-2(진공 펌프)의 전원을 끄고 질소 NF에 대한 진공도 함께 중단시킨다. 질소 NF 공급은 계속 켜고 있다. 샘플을 채취하거나 제품을 포장하기 이전에 바깥쪽 밸브는 제거된다.
- [0759] 제품은 사전에 계량되고 깨끗한 HDPE 닫힌-탑 컨테이너로 이동시켰다. A-2 교반기, P-1 와우케사 펌프 그리고 질소 NF 공급 모두 끈다. 배치가 완료되면 TIC-2 차트에 표시한다.
- [0760] 2개의 30gm (최소) 샘플을 마이크로 시험을 위해 제거하고 2개의 400gm (최소) 샘플을 물리화학적 시험을 위해 제거한다. 샘플 한 세트는 라벨하여 남겨두었다. 채워진 용기는 무게를 측정하였다. 배치 크기는 20kg이다.
- [0761] 실시예 39: CoQ10 3% 크림을 국소적으로 사용하여 SCCIS 를 치료하는 방법
- [0762] 위에서 기술한 (즉, 예 15와 16) CoQ10 3% 크림을 인-시츄(in situ) 피부 편평상피암 (SCCIS)에 국소적으로 사용하였다. 35명의 대상자들이 CoQ10 3% 크림 기름속물 에멀전 크림 베이스 약을 국소적으로 처리받았다. 약물은 햇볕이 차단된 채 상온에 보관되었다.
- [0763] 분석인구는 다음과 같이 정의하였다. (1) 치료하고자 의도한 인구 (Intent-to-Treat, ITT), (2) 안전성 (Safety) 인구 그리고 (3) 프로토콜에 대한 인구 (Per Protocol, PP). ITT인구는 시험용 약물(CoQ10 3%)을 조제받은 모든 대상자들을 포함한다. 안전성 인구는 시험용 약물을 최소 1회 이상 복용한 모든 대상자들을 포함한다. PP인구는 기준에서 조직학적 결과를 통해 SCCIS를 가지고 있는 대상자들이 6주동안 조직학적 검사를 받고

한번도 중간 방문을 거르지 않은 환자를 포함한다.

[0764] 대상자들은 건강한 남녀 성인으로 최소 한번은 조직학적으로 비안면성 SCCIS 병변을 확인한 사람들이다. 절제에 알맞은 SCCIS 병변은 최소 0.5 cm<sup>2</sup> 면적을 가지고 최대 2.0cm의 지름을 가지고 있고 임상시험 중간에 옷에 의해 햇빛으로부터 가릴 수 있는 곳에 있어야 한다. 대략 동일한 매일 아침시간에, 대상자는 병변 부위를 씻고 국소적 크림 약물을 작은 콩크기만큼 (50-100 mg) 납지나 도포용 도구에 내놓는다. 대상자는 크림을 병변과 주변 부위를 면봉이나 도포용 도구를 사용해 적용한다. 적용 후 최소 8시간동안 약물을 바른 부위를 씻지 않는다. 대략 동일한 매일 저녁시간에, 동일한 과정을 반복한다. 병변과 주변부위는 옷을 입어 햇빛으로부터 보호한다.

[0765] 치료 첫 번째 날, 병변의 지름을 재고 면적을 계산하였다. 병변부위를 또한 사진을 찍어 기록하였다. 각 1, 2, 3, 4 및 5주째에, 대상자의 생명징후(혈압, 맥박, 호흡수, 구강온도)를 평가하고 기록하였다. 아래 표에 근거한 피부발진에 대한 임상적 징후/증상은 CoQ10 3% 치료의 안정성을 측정하는 방법으로 사용되었다: 홍반, 피부의 벗겨짐, 건조함, 가려움, 뜨거움/따끔거림.

표 85

홍반

0	어떠한 관찰가능하지 않은 홍반
1	약한 핑크색, 소면적에 제한되지 않음
2	치료된 면적 대부분에서의 약간 홍조
3	치료된 면적 대부분상에 현저한 홍조
4	심한 홍조, 부종의존재, 가능한 미란

[0766]

표 86

박리/스케일링

0	어떠한 관찰가능하지 않은 스케일링 또는 박리
1	약한 플레이킹 또는 우발적인 소형 리프팅 스케일이 고립된 영역에 존재할 수 있다
2	중간정도의 플레이킹 /스케일링, 크랙이 쉽게 관찰됨, 처리된 영역의 큰 부분상의 스케일 리프팅의 엷지
3	현저한 스케일링, 약한 갈라짐, 처리된 면적 대부분에 대한 크랙킹 및 리프팅 스케일
4	존재하는 표피의 대형 박리 슈트

[0767]

표 87

건조증

0	처리된 영역 대부분상의 오일성 윤기
1	정상, 무건조증, 감지할만한 윤기 없음
2	약간의 건조, 처리된 면적의 소형 부분에 대한 약간의 윤기 외형
3	중간정도의 건조증, 처리된 영역의 대부분상에서 대우 윤기 없는 외관
4	심한 건조증, 전체 처리된 영역상에서 크랙킹

[0768]



표 88

가려움증

0	가려움증이 없음
1	피로는 약간의 가려움증, 일과 활동에 대한 영향 없음
2	약간의 가려움증은 대부분의 시간 동안 나타나고 일과 활동 또는 숙면에 대한 영향 없음
3	중간점도의 가려움증, 이따금씩 일과 활동 또는 숙면을 방해함
4	일과 활동 또는 숙면을 방해할 정도로 강한 가려움증

[0769]

표 89

작열감 /쑤신

0	작열감/쑤신이 없음
1	약간의 작열감/ 때로는 쑤신, 일과 활동에 영향 없음
2	약간의 작열감 /시간 대부분 쑤신, 일과 활동 또는 숙면에 대한 영향 없음
3	중간 정도의 작열감 /쑤신, 때로는 일과 활동 또는 숙면을 방해함
4	일과 활동 또는 숙면을 방해하는 강한 작열감/쑤신

[0770]

[0771]

홍반에 대한 안전성 평가: 기준치에서는, 32명의 대상자가 일정 정도의 홍반을 가지고 있었다(91.4%). 대부분의 대상자 (28명, 80%)는 경미하고 중간단계 증상을 보였고 4명의 대상자 (11.4%)는 붉게 표시되었다(3등급). 6주째, 홍반은 4명의 대상자에서 보이지 않았고(11.8%), 30명의 대상자에서 경미하고 중간단계 증상을 보였고 (88.2%) 반면에 3등급의 홍반은 관찰되지 않았다. 임상시험 도중에서 관찰된 최대 홍반 점수는 기준치에 비교하여 7명의 대상자에서는 개선되었고, 15명의 대상자에서는 변하지 않았으며, 13명의 대상자에서는 더 나빠졌다. 최종 홍반 점수는 기준치에 비교하여 11명의 대상자에서는 개선되었고, 22명의 대상자에서는 변하지 않았고, 2명의 대상자에서는 더 나빠졌다.

[0772]

피부가 벗겨짐/스켈링에 대한 안전성 평가: 기준치에서는, 27명의 대상자가 일정 정도의 피부가벗겨짐/스켈링을 가지고 있었고 (77.1%) 8명의 대상자는 전혀 없었다(22.9%) 6주째, 눈으로 볼 수 있는 피부벗겨짐/스켈링은 16명의 대상자에서 보이지 않았고 (47.1%), 17명의 대상자에서 경미한 증상을 보였고 (50%), 오진 1명의 대상자에서 중간점도의 증상을 보였다(2.9%). 임상시험 도중에서 관찰된 최대 홍반 점수는 기준치에 비교하여 7명의 대상자에서는 개선되었고, 20명의 대상자에서는 변하지 않았으며, 8명의 대상자에서는 더 나빠졌다. 최종 홍반 점수는 기준치에 비교하여 16명의 대상자에서는 개선되었고, 14명의 대상자에서는 변하지 않았고, 5명의 대상자에서는 더 나빠졌다.

[0773]

건조함에 대한 안전성 평가: 기준치에서는, 8명의 대상자가 경미하고 중간단계의 건조함을 가진 반면 (22.9%), 77.1%가 전혀 건조함이 없었고 (1등급) 혹은 치료한 부분에 기름이 빛났다 (0등급). 6주째, 1명을 제외한 모든 대상자가 0등급 혹은 1등급 건조함을 가졌다 (97.1%). 임상시험 도중에서 관찰된 최대 건조함 점수는 기준치에 비교하여 7명의 대상자에서는 개선되었고, 23명의 대상자에서는 변하지 않았으며, 5명의 대상자에서는 더 나빠졌다. 최종 건조함 점수는 기준치에 비교하여 13명의 대상자에서는 개선되었고, 21명의 대상자에서는 변하지 않았고, 1명의 대상자에서는 더 나빠졌다.

[0774]

가려움에 대한 안전성 평가: 기준치에서는, 대다수의 대상자가 가려움이 없었고 (74.3%), 가볍거나 간헐적인 가려움을 가졌으나 (20%), 2명의 대상자가 2단계 혹은 3단계 가려움을 보고하였다 (5.7%). 6주째, 가려움이 개선되어, 94.1%는 가려움이 없었고 오직 2명의 대상자가 가볍거나 간헐적인 가려움을 가졌다 (5.9%). 1주부터 6주에 걸쳐, 1단계 (가볍고 간헐적인 가려움)보다 더 나빠진 대상자는 없었다. 임상시험 도중에서 관찰된 최대 가려움 점수는 기준치에 비교하여 5명의 대상자에서는 개선되었고, 24명의 대상자에서는 변하지 않았으며, 6명의

대상자에서는 더 나빠졌다. 최종 가려움 점수는 기준치에 비교하여 9명의 대상자에서는 개선되었고, 24명의 대상자에서는 변하지 않았고, 2명의 대상자에서는 더 나빠졌다.

[0775] 뜨거움/따끔거림에 대한 안전성 평가: 기준치에서는, 대부분의 대상자가 뜨거움/따끔거림이 없었고 (94.3%), 2명의 대상자가 가벼운 증상이 있었다 (5.7%). 임상시험 동안에 사실성 이 점수는 변화가 없었다. 첫날부터 (기준치) 6주에 걸쳐, 1단계 이상의 증상을 가진 대상자가 없었고, 2명 이상 1단계 증상을 가진 대상자도 없었다. 임상시험 도중에서 관찰된 최대 뜨거움/따끔거림 점수는 기준치에 비교하여 2명의 대상자에서는 개선되었고, 28명의 대상자가 "뜨거움/따끔거림이 없는 상태"에서 변하지 않았으며, 5명의 대상자에서는 더 나빠졌다 (없다가 가볍게 생김). 최종 건조함 점수는 기준치에 비교하여 2명의 대상자에서는 개선되었고, 31명의 대상자에서는 변하지 않았고, 2명의 대상자에서는 더 나빠졌다.

[0776] CoQ10 3% 처리의 효과를 평가하기 위해 병변의 지름과 면적을 계산하였다. 6주간의 치료가 끝난 후에 종료방문을 통해 생명징후와 임상징후/증상을 기록하고 점수화했다. 신체적 검사도 6주째 종료방문에서 수행되었다. 종료방문에서 최종 크립적용 후 3시간 이내 금식한 뒤의 혈액샘플을 채취하여 CoQ10의 혈액 내 농도를 측정하였다. 병변부위를 사진을 찍어 기록하였고, 지름을 측정하고 면적을 계산하였다.

[0777] CoQ10 크림 3%를 SCCIS에 국소적으로 처리한 결과는 도면 4-9 전후로 설명된 것과 같은 효과를 나타냈다. 1차 유효성 평가지표는 6주째 타겟 병변의 음성 조직학적 평가로 정의된 완전반응(complete response)을 보인 대상자의 비율이다. 2차 유효성 평가지표는 6주째 타겟 병변의 면적이 (2개의 주요 지름의 결과) 최소 50%이상 감소한 것으로 정의된 부분반응(partial response)을 보인 대상자의 비율이다. 임상결과, ITT 인구의 23.5%가 6주째 완전반응을 보인 반면에 PP인구의 18.5%가 6주째 완전반응을 보였다.

[0778] 2차 유효성 결과, 6주째 ITT인구의 26.5%가 50% 부분반응을 보였고 2.9%가 75% 부분반응을 보였다. 부분반응은 2명의 대상자에서 1주째부터 관찰되기도 하였으며 8명의 대상자에서 2주째부터 관찰되기도 하였다. 가장 높은 부분반응 비율은 4주째와 5주째였다. 흥미롭게도, 6주째 완전반응을 보인 8명의 대상자 중, 4명의 대상자는 육안으로 관찰할 때 부분반응을 전혀 보이지 않았고 아무도 75%부분반응을 보이지 않았다. PP인구의 22.2%가 50% 부분반응을 보였고 0%가 75% 부분반응을 보였다. 병변면적의 평균변화와 평균비율변화는 6주째 ITT인구에서 각각  $0.3 \text{ cm}^2$  와  $-26.1\%$  였고, PP인구에서 각각  $-0.3 \text{ cm}^2$  와  $-23.4\%$  였다.

[0779] 종합적으로 CoQ10 3% 크림은 안전하고 내약성이 좋았다. 완전치유는 ITT인구의 약 25%에서 달성되었다.

[0780] 실시예 40: CoQ10 3% 크림을 국소적으로 사용하여 BCC 를 치료하는 방법

[0781] 기저세포암(BCC)는 피부의 악성종양 중 가장 흔한 질병으로 미국에서 가장 흔한 암종이다. 미국 암학회는 매년 800,000건이 넘는 새로운 새로운 기저세포암이 진단된다고 추측하고 있다. 표피상의 기저세포암(sBCC)는 잘 전이하지 않아서, 수술적 절제나 국소적 약물치료를 통해 대부분 치료가 가능하다.

[0782] 위에서 기술한 (즉, 실시예 15-16) CoQ10 3% 크림을 최소 한 개 이상의 표피상의 기저세포암(sBCC) 병변을 가지고 있는 것 외에는 건강한 160명의 대상자들에게 국소적으로 적용하였다. 최소  $0.5 \text{ cm}^2$  면적을 가지고 최대 2.0cm의 지름을 가지고 있는 타겟 병변을 치료에 지정하였다. sBCC 병변은 얼굴에 나지 않았어야 하고 임상시험 중간에 햇빛으로부터 차단되어야 한다.

[0783] 본 시험은 무작위 이중맹검 매개체를 조절하는 병행시험이다. 각 대상자는 무작위적으로 4개의 시험군 중에 한 개에 지정된다: 1.5% CoQ10 크림 QD (하루 한번 투여)와 매개체 크림 QD (하루 한번 투여), 3% CoQ10 크림 QD (하루 한번 투여)와 매개체 크림 QD (하루 한번 투여), 3% CoQ10 크림 BID (하루 두번 투여), 매개체 크림 BID (하루 두번 투여). 각 시험군은 40명의 환자를 가진다.

표 90

	AM	PM
1.	3% CoQ10	3% CoQ10
2.	비히클 B	3% CoQ10
3.	비히클 A*	1.5% CoQ10
4.	비히클 A	비히클 A

[0784]

[0785]

초기 스크리닝 방문에서, 병변의 지름을 측정하고 넓이를 계산하였다. 넓이는 가장 긴 2개의 직각 지름을 측정하고 곱하여  $cm^2$ 로 표시하였다. 대상자의 생명징후를 기록하고 신체적 검사를 수행하였다. 금식한 뒤의 혈액샘플을 채취하였고 완전혈구측정(CBC) 시험과 지질 패널을 이용한 임상화학 시험을 수행하였다. 혈액샘플은 기준치의 CoQ10 혈장 농도를 결정하기 위해 채취되었고 2개의 샘플을 채취하여 포장하였다. 소변검사도 진행하였고 아이를 임신했을 가능성이 있는 여성의 경우에는 소변 임신 검사도 진행하였다. 이 후, 대상자들은 다음과 같은 피부발진에 대한 임상징후/증상에 대해 점수를 매겼다: 홍반, 피부벗겨짐, 건조함, 가려움 및 뜨거움/따뜻거림

[0786]

임상시험 첫 번째 날 (제 1일), 스크리닝 방문에서와 같이 대상자의 생명징후를 다시 기록하고 피부발진에 대한 임상징후/증상에 대해 점수를 매겼다. 대상자는 부작용, 동시에 사용하는 국소적 제품의 사용, 동시에 사용하는 약물의 사용에 대해 인터뷰하였다. 스크리닝 방문에서와 같이 타겟 sBCC 병변을 사진찍은 후 병변의 지름을 측정하고 넓이를 계산하였다. 그 후에 대상자는 CoQ10약물이 들어간 약물키트를 받았다. CoQ10크림은 sBCC 병변과 그 주변 1cm에 6주동안 하루에 2번씩 바르게된다.

[0787]

약물을 바르기 위해서는 대략 동일한 매일 아침시간에, 대상자는 병변 부위를 씻고, 국소적 크림 약물을 AM튜브로부터 작은 콩크기만큼 (50-100 mg) 납지나 도포용 도구에 내놓는다. 대상자는 크림을 병변과 주변 부위를 면봉이나 도포용 도구를 사용해 적용한다. 적용 후 최소 8시간동안 약물을 바른 부위를 씻지 않는다. 대략 동일한 매일 저녁시간에, 동일한 과정을 PM튜브를 사용해 반복한다.

[0788]

각 1, 2, 3, 4 및 5주째에 대상자의 중간방문이 있다. 매 방문 시, 첫 번째 방문과 마찬가지로 대상자의 생명징후를 기록하였고 임상적 징후/증상에 대한 점수를 매겼다. 병변의 지름을 측정하고 넓이를 계산하였다. 대상자는 부작용, 동시에 사용하는 국소적 제품의 사용, 동시에 사용하는 약물의 사용에 대해 인터뷰하였다. 임상적 평가는 매주 진행하였다.

[0789]

치료 마지막인 6주째, 첫 번째 방문과 마찬가지로 대상자의 생명징후를 기록하였고 임상적 징후/증상에 대한 점수를 매겼다. 병변의 지름을 측정하고 넓이를 계산하였다. 신체검사도 역시 진행하였다. 최종 크림적용 후 금식한 뒤의 혈액샘플을 채취하였다. CoQ10의 혈액 내 농도를 측정하기 위하여 마지막 크림 적용 후 3시간 이내에 혈액샘플을 채취하였다. 완전혈구측정(CBC) 시험과 지질 패널을 이용한 임상화학 시험을 수행하였다.

[0790]

치료 후 4주째 (시험 후 10주째), 대상자는 최종 평가와 sBCC 병변부위를 절제하기 위해 재방문하였다. 첫 번째 스크리닝 방문에서와 마찬가지로 생명징후를 기록하였고 임상적 징후/증상에 대한 점수를 매겼다.

[0791]

110명 대상자의 병리학적 측면을 살펴본 후 치료 결과 CoQ10 크림 3%를 국소적으로 처리한 환자의 최소 20%에서 평가지표에 의해 측정될 수 있는 증상들이 사라진 것으로 나타났다. 특히, 110명 중 24명의 대상자는 8주째 병변 부위에서 생체조직 검사를 한 것을 근거로 sBCC 증가가 전혀 나타나지 않았다.

[0792]

실시예 41: CoQ10 국소처리의 약물동태학적 결과

[0793]

BALB/c 쥐 72마리를 무작위적으로 그룹당 8마리씩 총 9 그룹으로 나누었다. (그룹 I - IX). 그룹 I은 아무것도 처리하지 않았다. 제 0일째, 그룹 II-VIII은 국소적으로 실험물질 0.1g (C-14 동위원소로 라벨한 API CoQ10으로 만든 3%w/w CoQ10 크림을 포함하는 수중유형 크림 에멀전) 5  $mg/cm^2$ 씩 처리하였다. 동위원소를 포함한 API CoQ10을 3% 크림 배지에 섞어 제품당 약 50  $\mu Ci/g$  혹은 적용용량당 5  $\mu Ci$ 의 활성이 나타나도록 실험용 크림

제형을 만들었다. 실험물질을 각 그룹 II-IX에 있는 쥐의 등피부에 유리막대를 사용해 국소적으로 적용하였다. 그룹 II의 동물에 실험물질을 적용한 후 즉시 희생하여 혈액, 오줌, 배설물의 양 및 타겟 장기 (간, 췌장, 비장)의 무게를 측정하였다. 혈액은 혈청을 위해 작업하였고 각 장기는 균일하게 잘랐다. 그룹 III-VIII는 각각 실험물질 적용 후 2, 4, 8, 12, 18 및 24시간 뒤에 희생시켰고 동일한 샘플을 채취하였다. 그룹 IX는 실험물질 0.1g을 국소적으로 7일간 (0일째 ~ 6일째) 처리하였다. 6일째 마지막 실험물질을 적용한 후 24시간이 지난 후에 그룹 I과 IX는 희생시켰고 동일한 샘플을 채취하였다. 각 샘플은 분당붕괴수(DPM)에 대해 측정하였고 각 샘플타입별 평균 DPM을 그룹별로 계산하였다.

[0794] 평가는 각 시간대별로 혈청, 오줌, 배설물 및 타겟 장기 (간, 췌장, 비장)에서의 동위원소 방사능을 수준을 측정함으로써 이루어졌고 실험물질이 24시간 동안 경피침투의 상대적 수준을 측정하였고 실험물질을 적용하였을 때 어디에 약물이 축적되는지 측정하였다.

[0795] 각 그룹별 평균 샘플 무게를 아래 차트에 정리하였다. 출원된 바와 같은 본원은 표 91을 함유하지 않음을 주지한다.

표 92

	췌장	간	비장	변	소변	혈액
그룹 I	0.2907	1.4468	0.0776	0.0654	NA	0.4318
그룹 II	0.1691	1.3352	0.0935	0.0164	NA	0.4530
그룹 III	0.1300	1.0688	0.1777	0.0324	0.0890	0.4429
그룹 IV	0.1377	0.9893	0.0846	0.0292	0.0802	0.3770
그룹 V	0.1780	0.7105	0.0760	0.0299	0.0864	0.3222
그룹 VI	0.1156	0.8994	0.0595	0.0328	NA	0.3273
그룹 VII	0.2864	1.1312	0.3355	0.0160	0.0671	0.2077
그룹 VIII	0.1969	1.1929	0.0905	0.0350	0.0097	0.3093
그룹 IX	0.3068	1.2912	0.0839	0.1034	NA	0.3439
평균	0.2012	1.1184	0.1199	0.041	0.0665	0.3572

[0796]

[0797] 분당붕괴수(DPM)는 표 63에 나타냈고 각 동물에서 얻은 각 조직 샘플별로 신틸레이션 계수기로 측정하였다. 각 샘플타입에 대한 평균 DPM을 계산하였다. 결과값을 1mL 양으로 환산한 후에, 평균값을 평균 조직 무게로 나누어서 조직1그램당 DPM값을 산출하였다. 대조군 (그룹 I)결과값을 각 그룹의 결과에서 빼워서 배경 방사선 양을 제거하고 실제 각 샘플에 대한 조직 1그램에 대한 평균 DPM값을 산출하였다. 2,220,000으로 나눔으로써 결과는 조직 1그램에 마이크로큐리로 전환된다. 최종 결과는 각 조직 1그램당 피코큐리(마이크로큐리 x 1000)로 표시하였다. 각 장기에 대한 결과는 아래 표시하였다.

표 93

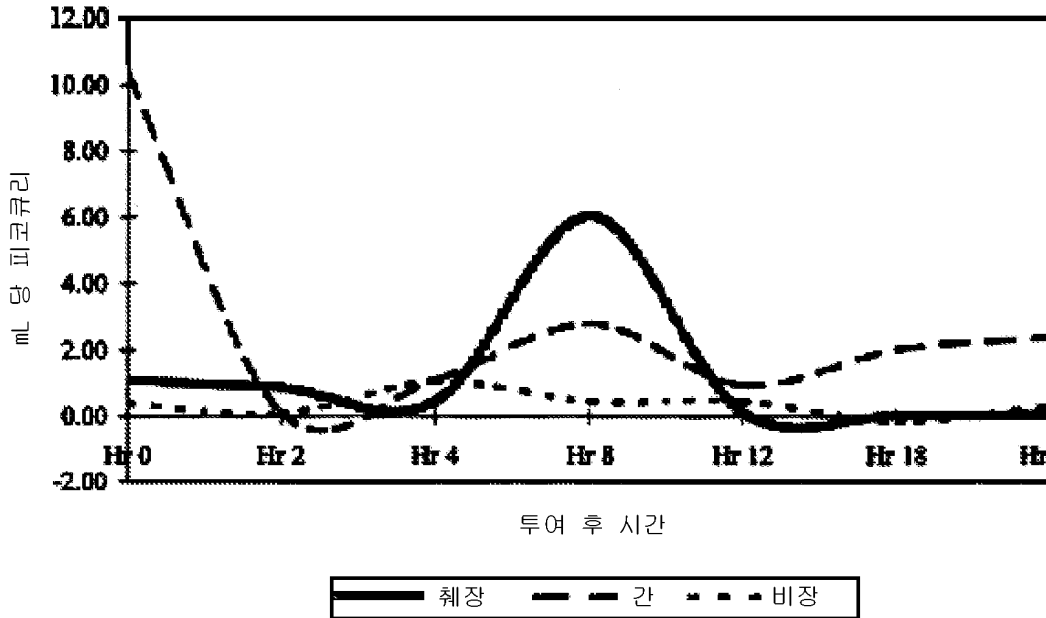
표적 장기 결과  
조직 g 당 피코큐리

	췌장	간	비장
Hr 0 - 그룹 II	1.09	10.34	0.40
Hr 2 - 그룹 III	0.87	0.14	0.09
Hr 4 - 그룹 IV	0.47	1.11	1.07
Hr 8 - 그룹 V	6.05	2.80	0.45
Hr 12 - 그룹 VI	0.13	0.96	0.46
Hr 18 - 그룹 VII	0.03	2.02	-0.15
Hr 24 - 그룹	0.07	2.40	0.030

[0798]

표 94

표적 장기 결과 그래프



[0799]

[0801]

투여 후 약 8시간 후에 실험물질이 대부분 체장에 축적되는 것을 보여주고 간에 좀 더 적은 양이 축적되는 것을 보여준다. 비장과 체장의 조직 1그램당의 피코큐리의 양이 투여 후 약 18시간이 지나면 거의 제로에 가깝게 감소한다. 투여 후 0시간째 DPM이 예외적으로 높게 나온 한 동물 때문에 간에서 0시간째 결과는 비정상이다. 이런 비정상적으로 높은 결과값이 나온 것에 대한 가능한 설명은 동물이 자신의 피부를 핥거나 혹은 투여한 곳을 문지른 뒤 발톱을 핥음으로써 실험물질을 직접 섭취하였다는 것이다. 이 경우 피부로 흡수하는 것보다 훨씬 빠르게 실험물질을 간으로 보낼 수 있다. 8시간 이후 간에서의 양은 12시간째 약간 줄어들지만 18시간째 약간 늘어나면서 24시간 내내 일정수준을 유지한다.

표 95

표적 장기 결과 (Cont.)

그림 II-VIII의 모든 동물의 표적 장기 각각에 축적된 시험 시표(test article)의 양을 조직 g 당 피코큐리로 하기표에 나타냈다.

	체장	간	비장
<b>Hr 0</b>	12.51%	52.30%	15.21%
<b>Hr 2</b>	9.99%	0.71%	3.42%
<b>Hr 4</b>	5.40%	5.61%	40.68%
<b>Hr 8</b>	69.46%	14.16%	17.49%
<b>Hr 12</b>	1.49%	4.86%	17.49%
<b>Hr 18</b>	0.34%	10.22%	-5.70%
<b>Hr 24</b>	0.80%	12.14%	11.41%

[0802]

[0803] 그룹 II-VIII는 실험물질을 4.112마이크로큐리 양만큼 처리하였다. 아래 차트는 각 시간대별 각 타겟 장기에서의 마이크로큐리의 양을 보여준다.

[0804]

표 96

	췌장	간	비장
그룹 II - 0 hrs	0.0011	0.0103	0.0004
그룹 III - 2 hrs	0.0009	0.0001	0.0001
그룹 IV - 4 hrs	0.0005	0.0011	0.0011
그룹 V - 8 hrs	0.0060	0.0028	0.0005
그룹 VI - 12 hrs	0.0001	0.0010	0.0005
그룹 VII - 18 hrs	0.0000	0.0020	-0.0002
그룹 VIII - 24 hrs	0.0001	0.0024	0.0003

[0805]

[0806] 이러한 숫자를 4.112 (각 용량별 마이크로큐리 양)으로 나누어서, 각 시간대의 각 장기에 있어서의 실험물질의 양을 나타내는 비율로 나타낸다. 아래 차트는 이러한 비율값을 나타낸다.

표 97

	췌장	간	비장
Hr 0	0.03%	0.25%	0.01%
Hr 2	0.02%	0.00%	0.00%
Hr 4	0.01%	0.03%	0.03%
Hr 8	0.15%	0.07%	0.01%
Hr 12	0.00%	0.02%	0.01%
Hr 18	0.00%	0.05%	0.00%
Hr 24	0.00%	0.06%	0.01%

[0807]

[0808]

[0809] 타겟 장기에 도달하는 실험물질의 평균 비율은 췌장, 각 그리고 비장에 각각 0.03%, 0.07% 그리고 0.01% 였다.

[0810] 체내 노폐물 샘플에 대해, 최종 결과는 mL당 피코큐리로 표시되었다. DPM을 1mL로 변환하고 그룹 I의 결과를 빼고 그리고 2,220,000으로 나누어 mL당 마이크로큐리값을 얻는 방법으로 계산하였다. 배설물과 오줌에 대한 mL당 평균 피코큐리값은 아래 차트와 그래프에 표시되었다.

[0811]

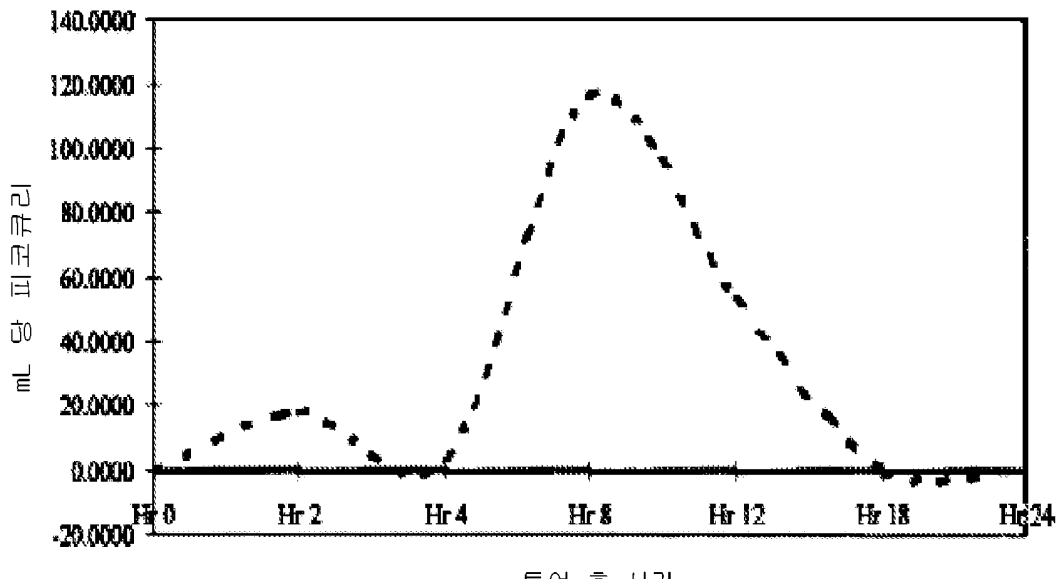
표 98

	1 mL 변	1 mL 소변
Hr 0 - 그룹 II	-0.0433	0.0002
Hr 2 - 그룹 III	18.2417	0.0000
Hr 4 - 그룹 IV	3.9548	0.0305
Hr 8 - 그룹 V	117.1009	0.0081
Hr 12 - 그룹 VI	52.7089	-0.0015
Hr 18 - 그룹 VII	0.7791	0.0057
Hr 24 - 그룹 VIII	0.1303	0.0016

[0812]

표 99

폐기물 시료 결과 그래프



[0813]

[0815] 투여 후 약 8시간 후에 실험물질이 대부분 배설물에 축적되는 것을 보여주고, 투여 후 약 12시간 후에도 계속 존재하는 것을 보여주지만 투여 후 약 18시간 후에는 대부분 낮아지는 것을 보여준다. 시험 도중 어느 시간대에도 실험물질이 오줌에 축적된다는 것을 보여주는 것은 없다.

[0816] 혈액 결과는 노폐물 샘플 결과를 계산하는 것과 동일한 방법으로 계산되었다. 혈액 내 mL당 피코큐리의 계산은 그룹 I에서의 DPM값 (대조군 혈액 결과)이 너무 높아 음수로 나타난다. 이것은 2개의 동물에서 예상보다 더 높은 DPM 값이 입력했기 때문이다. 혈액에 대한 결과는 아래 차트와 그래프에 나타냈다.

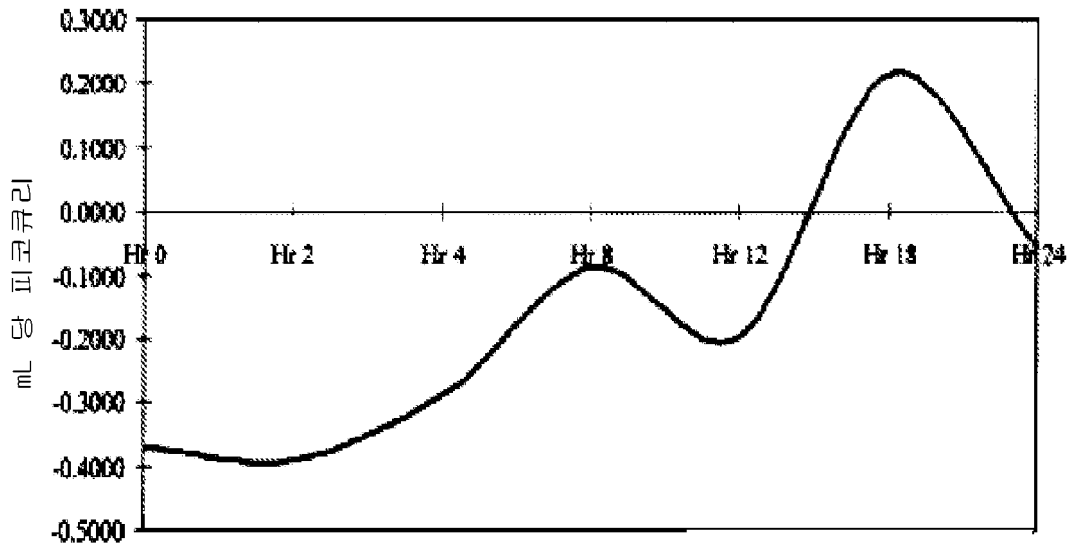
표 100

		1 mL 혈액
Hr 0 -	그룹 II	-0.3706
Hr 2 -	그룹 III	-0.3896
Hr 4 -	그룹 IV	-0.2877
Hr 6 -	그룹 V	-0.0890
Hr 12 -	그룹 VI	-0.1965
Hr 18 -	그룹 VII	0.2164
Hr 24 -	그룹 VIII	-0.0545

[0817]

표 101

혈중 결과 그래프



[0818]

투여 후 시간

[0819]

자료에서 보면, 투여 후 18시간째 혈액에 실험물질이 존재하는 것을 제외하고는 실험물질은 혈액에 축적되지 않는다. 특히 실험물질이 간과 췌장에서 관찰되는 만큼 혈액에 실험물질이 유의할 정도로 존재하지 않는 것은 이상한 것이다. 하나의 설명은 실험물질이 피부를 통해 흡수되면서 직접적으로 장기로 전달되는 것인데, 피부를 통해 들어간 뒤 혈관에 들어가지 않는 것은 실제로 가능하지 않다. 다른 가능성은 혈액에서 즉시 외부물질로 인지하여 실험물질을 간으로 보내는 것이다. 그룹 II의 마지막 투여는 오전 10:23분에 이루어지고 그룹 II의 첫 번째 동물 희생은 오전 10:45분에 이루어졌다. 이 사이의 22분은 혈액이 외부물질을 제거하기에 충분한 시간일 수 있다.

[0820]

그룹 IX의 동물들은 한번이 아니라 반복해서 투여를 받았고 실험물질을 7일동안 흡수하였기 때문에 그룹 IX 자료는 별도로 계산하였다. 그룹 IX 자료는 아래 차트에 정리되었다.



표 102

장기 시료에서, 조직 g 당 피코큐리

	췌장	간	비장
그룹 IX	0.12	2.07	1.19

[0821]

[0823] 그룹 II-VIII에 대한 조직 1그램에 대한 평균 피코큐리는 췌장, 간 그리고 비장에 있어 각각 1.24, 2.83 그리고 0.38이다. 장기에 대한 그룹 IX 결과는 췌장에 대한 평균값보다 낮았으며 간에 대한 평균값에 근접했고 비장에 대한 평균값보다 높았다. 7일째 비장에서 실험물질의 양이 증가하는 자료가 있으며 7일째 간에서의 실험물질의 양이 투여 후 18시간째와 24시간째 간에서 발견되는 양과 동일하다는 자료가 있다.

표 103

폐기물 시료 mL 당 피코큐리

	변	소변
그룹 IX	25.0650	-0.0011

[0824]

[0826] 그룹 II-VIII에 대한 배설물에 대한 mL당 평균 피코큐리는 27.55이고 오줌에 대해서는 0.0064이다. 그룹 IX의 배설물과 오줌에 대한 결과는 정상이며 배설물에서 최소한의 실험물질이 발견되었다.

표 104

혈액 mL 당 피코큐리

	혈액
그룹 IX	-0.0538

[0827]

[0829] 다른 그룹들과 같이, 그룹 IX 혈액결과는 실험물질이 혈액에 존재하지 않는 것을 보여준다.

[0830] 전체적인 결과에 따르면, 그룹간에 타겟장기의 무게, 배설물, 오줌 및 혈액이 양에는 유의한 차이가 없었다. 오줌에서는 유의한 수준의 실험물질이 발견되지 않았다. 그룹 I(대조군), II (0시간), VI(12시간) 으로부터는 오줌을 채취하지 않았다. 그룹VII(투여 후 18시간)를 제외하고, 실험물질은 시험내내 어느 시간대에서도 혈액에서 유의한 양이 발견되지 않았다. 가장 높은 조직1그램에 대한 피코큐리의 양과 mL당 피코큐리의 양은 그룹V(투여 후 8시간)에서 기록되었으며, 그 시간대에 배설물과 췌장에서 가장 집중된 것으로 발견되었다. 또 그룹V에서 간에서 높은 조직1그램에 대한 피코큐리의 양이 증가된 것으로 관찰되었다. 간에서 12시간째 약간 감소한 이후에 18시간째와 24시간째에서 일정하게 수준이 유지되었고 그룹 IX의 간에서 관찰되는 수준과 유사한 것으로 관찰되었다. (7일째 동물). 그룹 IX를 포함하여, 투여 후 8시간째 정점을 보인 이후에 췌장에서의 양은 거의 제로수준에 가깝게 감소하였다. 비장에서의 양은 4시간째 증가하다가 18시간째 거의 제로수준에 가깝게 감소하였다. 하지만, 그룹 IX에서는 이런 양이 증가되었고 이것은 7일째 비장에 실험물질이 축적되는 것을 가르키고 있다. 실험물질이 간과 췌장에서 발견되기 때문에 실험물질의 경피흡수 혹은 실험물질의 대사체가 있다는 것을 의미한다. 가능한 이동경로가 혈관을 통하는 것이라고 예측되기 때문에, 혈액에서 실험물질이 유의한 수준으로 발견되지 않는 것은 이상한 일이다. 가능한 설명으로는, 실험물질이 혈액에서 간이나 췌장으로 빠르게 이동되어

제거된다는 것이다. 또 다른 가능성은, 동물이 투여된 곳을 직접 핏거나 투여된 곳을 문지를 발톱을 핏음으로써 실험물질을 직접적으로 섭취하는 것이다.

[0831] 실시예 42: 웨스턴 블롯

[0832] 지난 50년이 넘는 기간 동안 내인성/외인성 인자가 악성세포로 전환의 근본적 원인과 같은 특정 과정에 영향을 준다고 암시하는 방대한 양의 정보가 만들어졌다. 임상과 기초 논문에서 암을 유전적 질병으로 정의하면서, DNA 구조와 기능의 변화가 암 발생과 진행에 중요한 역할을 한다는 증거를 제공했다(Wooster, 2010; Haiman, 2010). 1920년대 초기에 암 생성 병인에서의 근본적이 변화를 특성화 분석하는 작업에 관련된 Otto Warburg와 다른 연구자들은 두 개의 주요 관찰결과를 설명했다. (a) 산소 존재 하에 에너지 발생을 위한 ATP생성 과정에서 당을 운반하고 이용하는 세포의 능력- 바르버그 효과(Warburg Effect)로도 알려진 (b) 미토콘드리아 구조와 기능의 변화 - 미토콘드리아 ATP 생성 감소를 일으키는 전자 전달에서의 변화를 포함. 암을 대사적 장애로 보는 것과 같이 지난 몇 년간 암 병인에서 세포 생물에너지학의 중심역할에 대한 연구가 부활되었다.

[0833] 역사상, 유전자에서 돌연변이로 인해 세포 발현이 변화된다고 생각되어왔지만, 후성적 과정이 암 발생에서의 유전자 발현에 큰 영향을 주는 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침하는 문헌이 점점 쌓여가고 있다. 이것은 대부분 유전자에서 돌연변이 비율이 낮고 암세포에서 발생하는 많은(광범위한) 돌연변이를 일으킬 수 없다는 관찰을 통해 입증되었다. 후성적 변화는 메틸화와 히스톤 테일의 변형에 의해 조절되고, 두 가지 변화 모두 히스톤 아세틸화(ref)에 아세틸 CoA가 요구되는 것과 같이 보조인자를 필요로 하기 때문에 세포의 에너지(영양) 상태와 선천적으로 관련이 있다. 아세틸 CoA의 생합성은 세포내 에너지 상태를 유전자 발현과 활성의 조절에 직접 연결하면서 해당과정과 크랩 사이클에 의존한다.

[0834] 정상 세포에서, 미토콘드리아 산화적 인산화는 정상 생리활성과 세포 생존을 유지하는데 요구되는 에너지를 충족시키기 위해 충분한 ATP를 생성한다. 미토콘드리아 에너지 생성의 결과로 미토콘드리아에 손상을 주는 정상적이지 않은 생성, 활성 산소종(ROS)이 발생된다(refs). 미토콘드리아에 의한 만성 ROS 발생이 유전자 돌연변이를 누적증가를 일으킨다는 사실이 잘 정립되어 있고 이러한 현상은 암 발생의 병인으로 암시되어왔다. 암세포가 ROS 발생을 최소화하기 위해 미토콘드리아 호흡을 감소시키고 에너지 생성을 지속하기 위해 미토콘드리아 호흡을 해당과정으로 바꾼다고 암시되어 왔다. 그러므로, 산화적 인산화로부터 해당과정으로 에너지 발생을 점차 변화시키는 것은 세포에서 에너지 발생과 생리적 기능을 유지하는데 본질적이고 정상세포 표현형으로부터 암세포 표현형으로의 진행에 연관될 수 있다. 세포 에너지(생물 에너지학) 프로파일과 미토콘드리아 유전자 구성에서 축적된 변이(돌연변이)의 점진적 변화는 세포 대사체를 바꾼다. 미토콘드리아 인산화의 해당작용으로 전이의 결과와 같은 전체 세포 대사체 프로파일에서의 변화는 비정상적 생물 에너지에서 유도된 대사체 프로파일과 일치하고 암 발생을 뒷받침하는 근본적 원인이다. 비-암성 정상 미토콘드리아 산화적 인산화에 연관된 세포 생물 에너지학적 상태로 세포 대사체 변화를 이끌어내기 위해 내인성 분자를 이용한 표적 개입은 암 치료의 치료적 변수에 해당한다.

[0835] Epi-대사체 변화를 야기하는 MIM으로서의 조효소 Q10

[0836] 여기에 있는 자료는 조효소 Q10으로의 정상세포와 암세포 치료가 해당작용-미토콘드리아 산화 스트레스 연속체 내에서 핵심 생화학적 말단을 조절하는 단백질 발현에서의 변화와 연관이 있음을 입증한다. 웨스턴 블롯을 통한 단백질 발현과 산소 소비율 평가를 설명하는 자료의 조합은 정상세포에서 조효소 Q10에 노출된 후에 정상 해당작용과 미토콘드리아 호흡률에 큰 변화가 없었다고 밝혔다. 따라서, HDFa(정상 인간 성체 섬유아세포), HASMC(정상 인간 대동맥 평활근 세포), nFib(정상 섬유아세포), HeKa(정상 인간 각질세포)와 같은 정상 세포주에서 단백질 발현과 미토콘드리아 호흡률 수치가 기저 생리상태를 대표한다고 생각될 수 있다. HepG2(간암), PaCa-2(췌장암), MCF7(유방암), SK-MEL(흑색종), SCC-25(편평세포암)과 같은 암세포 세포주에서 단백질 발현과 미토콘드리아 호흡률의 어떠한 일탈은 이 경우엔 암인 질병의 시작/진행에 따른 변화를 대표한다. 실험적 증거가 암세포로의 조효소 Q10 노출이 정상세포를 연상시키는 세포 병리생리학적 개편과 연관 있다는 가설을 뒷받침한다. 세부적으로, 여기에서 제공된 자료는 암세포에서 조효소 Q10 노출이 정상 세포에서 관찰된 해당경로와 미토콘드리아 산화적 인산화에서의 변화와 연관 있음을 입증하고, 그러한 정상세포에서 관찰된 변화는 세포 구조의 전반적 개편을 유도한다.

[0837] 정상세포에서, 해당과정 산물의 변수는 미토콘드리아 산화적 인산화(OXPPOS), 예. 미토콘드리아 OXPPOS를 통해 ATP를 생성하고 이에 필요한 환원 당량을 생성하기 위한 크랩스 회로(트리카복실산 회로, TCA, 또는 구연산 회로)에 들어가기 위해 해당경로를 통한 당에서의 피루브산 발생과 연결되어 있다. 그러므로, 정상세포에서 해당 과정에 연관된 유전자 산물의 발현과 기능적 지향은 피루브산의 적절한 생성과 크랩스 회로로 피루브산의 유입

에 대해 준비된다. 암세포에서의 해당작용과 크랩스 회로에 관여하는 중요 단백질의 잘 조절되지 않은 발현과 기능이 해당작용을 증가시키고 미토콘드리아 기능을 현저히 저하시킨다. 미토콘드리아 호흡사슬에 선택적으로 영향을 주는 내인성 분자인 조효소 Q10에 대한 암세포의 노출은 미토콘드리아에서 에너지 생산(즉, ATP 생성)을 회복시키는 것과 같은 생물 에너지학적 변화를 촉진시키기 위해 해당작용과 크랩스 회로의 단백질 발현을 변화시킨다(정상화시킨다).

- [0838] 실험방법
- [0839] 웨스턴 블롯 실험 1
- [0840] 실험에 사용된 세포는 HDFa와 MCF-7 이었고 조효소 Q10 두 농도, 50  $\mu$ M과 100  $\mu$ M 로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24시간 후 채취되었다. 전체 세포 응집체는 C7 완충액 1mL에 차례로 재부유되었고, 라벨된 15mL 시험관으로 옮겨졌다. 샘플은 얼음이 있는 저온 실험실에서 14번 세팅의 6초음파 펄스를 이용하여 초음파처리되었다. 샘플은 초음파 후 짧은 시간 동안 2500g까지 회전시켜졌고 2ml 시험관에 옮겨 닦아졌다. 50mL 샘플 시험관에 남아 있는 거품을 이용하여 각 샘플의 pH(pH는 9.0이 되어야 함)가 측정되었다.
- [0841] 1M 아크릴아미드 10  $\mu$ l, 트리부틸포스펜 25  $\mu$ l를 추가하고 90분 동안 간헐적으로 저으면서 항온처리하여 각 샘플의 알킬화와 환원이 수행되었다. 항온처리 후, 1M DTT 10  $\mu$ l이 추가되고 시험관은 20도에서 10분 동안 20,000g로 회전시키고 상층액을 라벨된 Amicon Ultra 원심분리기 필터 단위 10 k 컷 오프 (Millipore catalog # UFC 801024)로 옮겼다. 샘플은 2500g에서 15분 동안 2 간격으로 회전시켰다. 전도도 측정기를 이용하여 샘플과 챔스에 대한 전도도를 측정하였다. 샘플의 전도도가 높으면, 완충액 교환을 위해 1ml 챔스(chaps)가 추가되었고 다시 2500g에서 부피가 250  $\mu$ l이 될 때까지 회전시켰다. 전도도가 200이거나 그 이하일 때는 샘플은 5분 간격으로 2500g에서 상층액의 부피가 150-100  $\mu$ l 사이가 될 때까지 회전시켜졌다. 샘플의 상층액은 에펜도르프 튜브에 옮겨졌고 BSA를 표준물질로 하여 Bradford 분석이 수행되었다.
- [0842] 샘플은 위에 명시된 표준 프로토콜 대로 처리되었고 각 샘플에 있는 단백질의 양이 Bradford 분석법을 이용하여 측정되었다. 단백질 10  $\mu$ g과 동일한 세포 부피가 아래 있는 것처럼 라벨리 로딩 염료 (LDS)와 함께 준비되었고 MilliQ water(MilliQ 수)가 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE 겔 (Invitrogen, cat # NP0323Box)에 쓰였다.
- [0843] 겔은 200V에서 NOVEX Xcell Surelock 시스템과 1X MOPS 완충액을 이용하여 50분 동안 수행되었다. 그 후 겔은 한 시간 동안 NOVEX Xcell 슈어록 웨트(Surelock wet) 트랜스퍼 프로토콜을 이용하여 30V에서 이동되었다. 블롯은 인비트로젠으로부터의 심플리 블루 세이프테인(LC6065)으로 염색되었다.
- [0844] HDFa와 MCF-7 샘플에서 IDH1과 ATP 시트르산 분해효소 수준
- [0845] 이동 후, 각 블롯을 2개의 왓만 필터 페이지 사이에 놓이도록 하고 15-20분간 건조시켰다. 건조 후 HB 연필을 사용하여 블롯에 날짜, 샘플 종류, 블롯1 또는 블롯2가 라벨되었다. 분자량 마커는 연필로 윤곽을 그렸고 파란색 마커는 한줄로 색깔있는 마커는 두줄로 표시하였다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었다. 4°C에서 밤새 흔들면서 항온처리함으로써 블롯 1은 5% BSA(1:1000 희석) TBST안에서 IDH1(Cell Signaling # 3997)에 대한 일차 항체로 탐침되었고 블롯 2는 1:1000 희석된 5% BSA(Cell Signaling #4332) 안에서 ATP 시트르산 분해효소에 대한 토기 다클론 항체로 탐침되었다. 일차 항체와 함께 밤새 항온처리한 후, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항토끼; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한시간 뒤에, 블롯은 TBS-T( 각각 1X-15' ; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25  $\mu$ M 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.
- [0846] HDFa와 MCF-7 샘플에서의 액틴 수준
- [0847] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양하고 TBS-T로 10분간 두번 세척되었고 50°C에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리되었으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척하여 박리되었다. 두 개의 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 1:5000으로 희석된 5% BSA(Sigma catalog # A5316, clone AC-74)에서 액틴에 대한 항체로 실온에서 흔들면서 한 시간 동안 탐침되었다. 액틴에 대한 일차 항체로 한 시간 동안 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항마우스; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 시한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한시간 뒤

에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0848] 웨스턴 블롯 실험 2

[0849] 실험에 사용된 세포는 SKMEL28, SCC-25, nFib, Heka이었고 조효소 Q10 두 농도, 50 μM과 100 μM 로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 3, 6 및/또는 24시간 후 채취되었다. 샘플은 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE 겔에서 위에서 설명된 것과 같이 처리되고 시험되었다. 겔은 위에서 설명된 것처럼 작동되고, 이동되고 염색되었다.

[0850] 4개의 세포주에 대한 IDH1 수준

[0851] 이동 후 블롯이 15-20분간 건조되었고, 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5' 로 3회 세척되었다. 그 후 4°C에서 밤새 흔들면서 항온처리함으로써 블롯은 5% BSA(1:1000 희석) TBST안에서 IDH1(Ce11 Signaling # 3997)에 대한 일차 항체로 탐침되었다. IDH1에 대한일차 항체와 함께 밤새 항온처리한 후, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항토끼; 1:10,000 희석)로 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0852] 4개 세포주에서 ATP 시트르산 분해효소 수준

[0853] 이소시트르산 데하이드로게나제 블롯은 메탄올로 30분간 배양하고 TBS-T로 10분간 두번 세척되었고 50°C에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 1:1000으로 희석된 5% BSA (Cell Signaling #4332)에서 ATP 시트르산 분해효소에 대한 항체로 4°C에서 흔들면서 한 시간 동안 탐침되었다. ATP 시트르산 분해효소에 대한 일차 항체로 한 시간 동안 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항토끼; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0854] 4개의 각기 다른 세포주에서 액틴 수준

[0855] ATP 시트르산 용해요소 블롯은 메탄올로 30분간 배양하고 TBS-T로 10분간 두번 세척되었고 50°C에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5'로 3회 세척되었으며 1:5000으로 희석된 5% BSA (Sigma catalog # A5316, clone AC-74)에서 액틴에 대한 항체로 실온에서 흔들면서 한 시간 동안 탐침되었다. 액틴에 대한 일차 항체로 한 시간 동안 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항마우스; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0856] 웨스턴 블롯 실험 3

[0857] 실험에 사용된 세포는 HepG2, HASMC, PACA2 이었고 조효소 Q10 두 농도(50 μM과 100 μM)로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 48시간 후 채취되었다. 본 실험(웨스턴 블롯 실험 3)과 이 예에서 아래 설명된 모든 실험(웨스턴 블롯 실험 4-9)에서, 세포는 5mM 당("5G") 또는 22mM 당("22G") 중 하나에 추가적으로 처리되었다. 세포에서 유래된 샘플은 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE 겔에서 위에서 설명된 것과 같이 처리되고 시험되었다. 겔은 위에서 설명된 것처럼 작동되고, 이동되고 염색되었다.

[0858] HASMC 대 PACA2 와 HepG2에서 IDH1, ATP시트레이트 리아제, 액틴 수준

[0859] IDH1, ATP 시트르산 용해요소, 액틴 수준은 위에 설명된 것처럼 블롯을 IDH1, ATP 시트르산 용해요소, 액틴에

대한 일차 항체로 탐침함으로써 확인되었다.

[0860] 웨스턴 블롯 실험 4

[0861] 본 실험에 사용된 세포는 HepG2이고 조효소 Q10 두 농도, 50 μM와 100 μM로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24 시간 또는 48시간 후 채취되었다. 본 실험에서 세포는 5mM 글루코스("5G") 또는 22mM 글루코스("22G")로 추가로 처리하였다. 세포로부터 유래된 샘플을 가공하고 상기된 바와 같이 4 내지 12%의 비스-트리스 Novex NuPAGE 겔 상에 진행한다. 겔을 상기된 바와 같이 전개하고 전달하고 염색시킨다.

[0862] HepG2 세포에서 젯산 데하이드로게나제 수준

[0863] 이동 후 블롯이 15-20분간 건조되었고, 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5'로 3회 세척되었으며 그 후 4℃에서 밤새 흔들면서 항온처리함으로써 블롯은 5% BSA(1:1000 희석)에서 젯산 데하이드로게나제 (abcam ab2101; 다클론)에 대한 일차 항체로 탐침되었다. 젯산 데하이드로게나제에 대한 일차 항체와 함께 밤새 항온처리한 후, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(토끼의 항염소; 1:10,000 희석)로 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0864] HepG2 세포에서 피루베이트 키나제 근육형(PKM2) 수준

[0865] 젯산 데하이드로게나제 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 2개의 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5'로 3회 세척되었으며 1:500으로 희석된 5% BSA (NOVUS BIOLOGICALS catalog # H00005315-D01P)에서 피루브산 키나제 M2에 대한 토끼 다클론 항체로 4℃에서 흔들면서 탐침되었다. 피루브산 키나제 M2에 대한 일차 항체로 밤새 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항토끼; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0866] HepG2 세포에서 피루브산 데하이드로게나제 베타 수준

[0867] 피루브산 키나제 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 2개의 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 항체의 박리와 ECF 시액이 효과가 있었음을 확인한 후, 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 TBS-T(각각 1X-15' 2X5'로 3회 세척되었으며 1:500으로 희석된 5% BSA (ABNOVA catalog # H00005162-M03)에서 피루베이트 데하이드로게나제에 대한 토끼 항체로 4℃에서 흔들면서 밤새 탐침되었다. 피루브산 데하이드로게나제에 대한 일차 항체로 밤새 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항마우스; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0868] HepG2 세포에서 액틴 수준

[0869] 피루베이트 데하이드로게나제 블롯은 박리된 후 위에 설명된 것처럼 액틴으로 재탐침되었다.

[0870] 웨스턴 블롯 실험 5

[0871] 본 실험에 사용된 세포는 MIAPACA2 (PACA2) 이고 조효소 Q10 두 농도, 50 μM와 100 μM 로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24시간 또는 48시간 후 채취되었다. 본 실험에서 세포는 5mM 글루코스("5G") 또는 22mM 글루코스("22G")로 추가로 처리하였다. 세포로부터 유래된 샘플을 가공하고 겔을 상기된 바와 같이 전개하고 전달하고

염색시킨다.

- [0872] PaCa2 세포에서 락테이트 데하이드로게나제(LDH)와 피루베이트 데하이드로게나제(PDH) 수준
- [0873] LDH와 PDH 수준은 위에 설명된 것과 같이 LDH와 PDH에 대한 일차 항체로 블롯을 성공적으로 탐침함으로써 측정되었다.
- [0874] PaCa2 세포에서 카스파아제3 수준
- [0875] 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50°C에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 2개의 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 1:200으로 희석된 5% BSA (Santacruz Biotechnology # sc7272)에서 카스파아제 3에 대한 항체로 4°C에서 흔들면서 밤새 탐침되었다. 카스파아제 3 대한 일차 항체로 밤새 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 이차 항체(항마우스; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 한 시간 동안 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.
- [0876] 웨스턴 블롯 실험 6
- [0877] 본 웨스턴 블롯 실험에 사용된 세포는 PC-3, HepG2, MCF-7, HDFa, PACA2 이고 조효소 Q10 IV 제조법으로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24시간 후 채취되었다. 본 실험에서 세포는 추가로 5mM 글루코스("5G") 또는 22mM 글루코스("22G")로 처리하였다. 세포 기원의 샘플은 처리되었고 겔은 상기된 바와 같이 전개하고 전달하고 염색시킨다.
- [0878] 각기 다른 세포종류에서 카스파아제3과 액틴 수준
- [0879] 카스파아제3과 액틴의 수준은 위에 설명된 것과 같이 카스파아제3과 액틴에 대한 일차 항체로 블롯을 성공적으로 탐침함으로써 측정되었다.
- [0880] 웨스턴 블롯 실험 7
- [0881] 본 웨스턴 블롯 실험에 사용된 세포는 인간 대동맥 평활근 세포(HASMC)이고 조효소 Q10 두 농도, 50 μM 또는 100 μM로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24시간 또는 48시간 후 채취되었다. 위에서 설명된 것과 같이 HASMC 샘플은 처리되었고 겔은 작동되고, 이동되고 염색되고 스캔되었다.
- [0882]
- [0883] 액틴에 대한 시험 프로토콜:
- [0884] 액틴 수준은 위에 설명된 것처럼 블롯을 액틴에 대한 일차 항체로 탐침하여 측정하였다.
- [0885] Hif 1 알파, 카스파아제3, PDHB에 대한 실험 프로토콜
- [0886] 액틴 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50°C에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 1:200으로 희석된 5% BSA 부드럽게 흔들며 밤새 4°C에서 항온처리)에서 Hif 1 알파, 카스파아제 3 또는 PDHB 에 대한 항체로 탐침되었다. Hif 1알파(Abcam ab2185; 항토끼)에 대한 일차 항체는 5% BSA에 1:500으로 희석되어 있었다. 카스파아제 3(Santacruz sc7272; 항토끼)에 대한 일차 항체는 5% BSA에 1:200으로 희석되어 있었다. 피루베이트 데하이드로게나제 베타(PDHB)( Novus Biologicals H00005162-M03; 항마우스)에 대한 일차 항체는 5% BSA에 1:500으로 희석되어 있었다. 일차 항체로 밤새 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (PDHB 항마우스; Hif 1a과 카스파아제 3 항토끼:10,000 희석)로 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0887] PKM2, SDHB, SDHC에 대한 실험 프로토콜:

[0888] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 1:200으로 희석된 5% BSA 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 PKM2, SDHB 또는 SDHC에 대한 항체로 탐침되었다. SDHC(ABNOVA H00006391-M02; 항마우스)에 대한 일차 항체는 1:500으로 희석되어 있었다. SDHB에 대한 일차 항체는 Abcam ab4714-200; 항마우스; 1:1000 희석에서 얻었다. 피루브산 키나제 M2(PKM2)에 대한 일차 항체는 Novus Biologicals H00005315-D0IP; 항토끼; 1:500 희석에서 얻었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (PDHB 항마우스; Hif 1a과 카스파아제 3 항토끼:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 탐침되었다. 이차 항체로 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0889] LDH 및 Bik에 대한 실험 프로토콜:

[0890] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 TBS-T에 있는 5% BSA에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 LDH 또는 Bik에 대한 항체로 탐침되었다. LDH에 대한 일차 항체는 Abcam ab2101; 항염소; 1:1000 희석에서 얻었다. Bik에 대한 일차 항체는 Cell Signaling #9942; 항토끼; 1:1000 희석에서 얻었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (LDH 항염소; Jackson Laboratories) 와 Bik 항토끼; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0891] 웨스턴 블롯 실험 9

[0892] 사용된 세포는 HepG2이고 조효소 Q10 두 농도, 50 μM 또는 100 μM로 처리되거나 되지 않았으며, 처리 24시간 또는 48시간 후 채취되었다. 본 실험에서 세포는 추가로 5mM 글루코스("5G") 또는 22mM 글루코스("22G")로 처리하였다. 세포 기원의 샘플은 처리되었고 겔은 상기된 바와 같이 전개하고 전달하고 염색시킨다.

[0893] 액틴에 대한 실험 프로토콜:

[0894] 액틴 수준은 위에 설명된 것처럼 블롯을 액틴에 대한 일차 항체로 탐침하여 측정하였다.

[0895] 카스파아제3과 MMP-6에 대한 실험 프로토콜:

[0896] 액틴 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15' 2X5')로 3회 세척되었으며 5% BSA에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 카스파아제3 또는 MMP-6에 대한 항체로 탐침되었다. 카스파아제3(Abcam ab44976-100; 항토끼)에 대한 일차 항체는 5% BSA에서 1:500으로 희석되었다. MMP-6(Santacruz scMM0029-ZB5; 항마우스)에 대한 일차 항체는 5% BSA에서 1:100으로 희석되었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (MMP-6 항마우스; 카스파아제 3 항토끼; 1:10,000희석)로 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0897] LDH에 대한 실험 프로토콜:

[0898] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15'2X5'로 3회 세척되었으며 5% BSA 또는 5% 우유에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 LDH에 대한 항체로 탐침되었다. LDH 080309b1 (Abcam ab2101; 항염소)에 대한 일차 항체는 5% 우유에서 1:1000으로 희석되었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (Jackson Immuno Research 항염소; 1:10,000 희석; 305-055-045)로 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0899] 트랜스알돌라아제와 Hif1a에 대한 실험 프로토콜:

[0900] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15'2X5'로 3회 세척되었으며 5% BSA에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 트랜스알돌라아제 또는 Hif1a에 대한 항체로 탐침되었다. 트랜스알돌라아제 (Abcam ab67467; 항마우스)에 대한 일차 항체는 1:500으로 희석되었다. Hif1a (Abcam ab2185; 항토끼)에 대한 일차 항체는 1:500으로 희석되었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (항마우스 또는 항토끼; 1:10,000 희석)로 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0901] IGFBP3과 TP53에 대한 실험:

[0902] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15'2X5'로 3회 세척되었으며 5% BSA에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 IGFBP3 또는 TP53에 대한 항체로 탐침되었다. IGFBP3 (Abcam ab76001; 항토끼)에 대한 일차 항체는 1:100으로 희석되었다. TP53 (Sigma Aldrich AV02055; 항염소)에 대한 일차 항체는 1:100으로 희석되었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (항토끼; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.

[0903] 트랜스알돌라아제와 PDHB에 대한 실험 프로토콜:

[0904] 상기 블롯은 메탄올로 30분간 배양되고 TBS-T로 10분간 두 번 세척되었고 50℃에서 스트리핑 완충액으로 30분간 항온처리하였으며 100ml 또는 그 이상의 TBS-T로 각각 30분간 2회 세척함으로써 박리되었다. 블롯은 레이저 스캐너에서 완전 스트리핑 되었는지 확인하기 위해 스캔되었다. 블롯은 5초간 메탄올로 활성화되었고, 물로 5분, TBST로 15분간 세척되었다. 블롯은 실온에서 TBS-T 내 5% 차단시약으로 한 시간 동안 차단되었고 그 후 실온에서 TBS-T(각각 1X-15'2X5'로 3회 세척되었으며 5% BSA에서 부드럽게 흔들며 밤새 4℃에서 항온처리함으로써 트랜스알돌라아제 또는 PDHB에 대한 항체로 탐침되었다. 트랜스알돌라아제 (Santacruz sc51440; 항염소)에 대한 일차 항체는 1:200으로 희석되었다. PDHB (Novus Biologicals H00005162-M03; 항마우스)에 대한 일차 항체는 1:500으로 희석되었다. 일차 항체로 배양된 후, 막은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 실온에서 1시간 동안 이차 항체 (항염소 또는 항마우스; 1:10,000 희석)로 진탕기(orbital tilting shaker)에서 탐침되었다. 항온처리한지 한 시간 뒤에, 블롯은 TBS-T(각각 1X-15'; 2X 5')로 3회 세척되었고 그 후 ECF 시액으로 5분간 배양되었으며 그 후 각 블롯은 25 μM 해상도, 16비트, 그린 레이저, 400V와 500V에서 5100 후지 레이저 스캐너로 스캔되었다.



[0905] 결론:

[0906] 이소시트르산 데하이드로게나제-1 (IDH-1)

[0907] 이소시트르산 데하이드로게나제는 미토콘드리아 기질 내에서 주로 일어나는 TCA 회로 포함된 효소 중 하나이다. 그러나 IDH1은 이소시트르산의 알파-케토글루타레이트로의 산화적 탈탄산 반응을 촉매하는 효소의 시토졸 형태이고 두단계 과정에서 이산화탄소를 발생한다. IDH1은 시토졸과 퍼옥시좀에 존재하는 NADP<sup>+</sup> 의존적 형태이다. IDH1은 Ser113 인산화에 의해 불활성화 되고 시트르산 회로가 없는 종들을 포함해서 많은 종에서 발현된다. IDH1은 정상적으로 종양 억제자 기능을 하고, IDH1이 불활성화 되면 HIF-1 회로(Bayley 2010; Reitman, 2010)의 활성화를 통해 암 발생에 부분적으로 기여한다. 최근의 연구에서 교모세포종의 병인에서 IDH1의 불활성화 돌연변이가 연루되었음을 보여주었다(Bleeker, 2009; Bleeker, 2010)

[0908] 조효소 Q10으로의 처리는 MCF-7, SKMEL28, HepG2, PaCa-2 세포를 포함한 암세포주에서 IDH1의 발현을 증가시켰다. SCC25 세포주에서는 발현이 중간 정도로 증가하였다. 일차 인간유래 섬유아세포 HDFa, nFIB와 인간 대동맥 평활근 세포 HASMC의 대조배양에서 조효소 Q10에 대한 반응으로 IDH1의 발현 패턴이 유의하게 변화함을 입증하지 못했다. 알파-케토글루타레이트(알파-KG)는 TCA 회로의 중요한 중간체이고, 이소시트르산으로부터 생화학적으로 합성되며 최종적으로 숙시닐 CoA로 변환되며 약물이 될 가능성이 있는 MIM이고 epi-전환인자이다. 알파-KG는 세포에 의해 회로의 중간체를 보충하는 데 사용될 수 있고 따라서 산화적 인산화를 증가시키기 위한 환원당량을 생성시킬 수 있기 때문에 알파-KG의 발생은 TCA 회로에서 중대한 시점으로서의 역할을 한다. 따라서, 조효소 Q10 매개된 IDH1 발현의 증가는 중간체 형성을 야기하고 이것은 미토콘드리아 TCA 회로에 암세포에서 산화적 인산화를 증가시키는데 사용될 수 있다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

표 105

HDFa 및 MCF-7에서 IDH1

조성	평균 정상화된 강도
HDF, 배지	346
HDF24-50-조효소 Q10	519
HDF24-100-조효소 Q10	600
MCF, 배지	221
MCF24-50-조효소 Q10	336
MCF24-100-조효소 Q10	649

[0909]

표 106

처리 후 HASMC 대 HepG2에서 IDH1

양-조성	정상화된 강도
HAS5g48-배지	20
HAS5g48-50-조효소 Q10	948
HAS5g48-100-조효소 Q10	1864
HAS22G48-배지	1917
HAS22G48-50-조효소 Q10	1370
HAS22G48-100-조효소 Q10	1023
Hep5g48-배지	14892
Hep5g48-50-조효소 Q10	14106
Hep5g48-100-조효소 Q10	15774
Hep22G48-배지	16558
Hep22G48-50-조효소 Q10	15537
Hep22G48-100-조효소 Q10	27878

[0910]

표 107

처리 후 HASMC 대 PACA2에서의 IDH1

양 - 조성	정상화된 강도
HAS5g48-배지	562
HAS5g48-50-조효소 Q10	509
HAS5g48-100-조효소 Q10	627
HAS22G48-배지	822
HAS22G48-50-조효소 Q10	1028
HAS22G48-100-조효소 Q10	1015
PACA5g48-배지	1095
PACA5g48-50-조효소 Q10	1095
PACA5g48-100-조효소 Q10	860
PACA22G48-배지	1103
PACA22G48-50-조효소 Q10	1503
PACA22G48-100-조효소 Q10	1630

[0911]

[0912] **ATP 시트레이트 리아제(ACL)**

[0913] ATP 시트레이트 리아제(ACL)는 호모테트라머(~126kd) 효소이고 시토졸에서 아세틸 CoA와 옥살아세테이트 형성을 촉매한다. 이 반응은 지방산, 콜레스테롤, 아세틸콜린 생합성과 당 생성작용에서 매우 중요한 첫 단계이다 (Towle et al., 1997). 영양소와 호르몬이 이 중요 효소의 발현 수준과 인산화 상태를 조절한다. Akt와 PKA에 의한 ACL의 Ser454 인산화가 보고되었다(Berwick., DC MW et al., 2002; Pierce MW et al., 1982).

[0914] 이 자료는 정상세포와 암세포에서 ATP 시트레이트 리아제에 대한 조효소 Q10의 효과가 있다고 설명한다. 이와 일관되게 암세포에서 용량의존적 ACL 효소 발현의 감소가 관찰되었다. 이와 대조적으로 정상세포에서 ACL 발현은 증가하는 경향을 보였다. 시토졸 ACL은 성장인자 자극과 분화 중에 세포에서 히스톤 아세틸화에 필수적이라고 밝혀졌다. ACL이 종양의 과정에서 중요한 과정인 시토졸 당에서 나온 시트르산을 히스톤 아세틸화에 필수적인 아세틸 CoA를 만들기 위해 이용한다는 사실은 조효소 Q10에 의해 유도된 ACL 발현이 암세포 기능에 영향을 미친다는 것을 설명한다. 시토졸 ACL에 의해 시트르산에서 생성된 아세틸 CoA는 세포 분열 중 새로운 지방과 콜레스테롤의 생합성을 위한 근원물질로서 작용한다. 따라서, 조효소 Q10이 유도한 ACL 발현의 변화는 아세틸 CoA가 정상세포 대 암세포에서 지방과 콜레스테롤 생합성하는 능력을 변화시킨다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되

어 있다.

표 108

HDFa와 MCF-7에서의 ATPCL

조성	평균 정상화된 강도
HDF-배지	~ 15000
HDF-50-조효소 Q10	~ 17500
HDF-100-조효소 Q10	~ 25000
MCF-배지	~ 7500
MCF-50-조효소 Q10	~7500
MCF-100-조효소 Q10	~ 12500

[0915]

표 109

HASMC 대 HepG2에서의 ATP 시트레이트 리아제 ~kd 밴드

양 - 조성	정상화된 강도
HAS5g48-배지	24557
HAS5g48-50-조효소 Q10	23341
HAS5g48-100-조효소 Q10	25544
HAS22G48-배지	27014
HAS22G48-50-조효소 Q10	21439
HAS22G48-100-조효소 Q10	19491
Hep5g48-배지	28377
Hep5g48-50-조효소 Q10	24106
Hep5g48-100-조효소 Q10	22463
Hep22G48-배지	24262
Hep22G48-50-조효소 Q10	31235
Hep22G48-100-조효소 Q10	50588

[0916]

표 110

HASMC대 PACA2에서 ATP 시트레이트 리아제 ~kd 밴드

양 - 조성	정상화된 강도
HAS5g48-배지	11036
HAS5g48-50-조효소 Q10	12056
HAS5g48-100-조효소 Q10	15265
HAS22G48-배지	18270
HAS22G48-50-조효소 Q10	15857
HAS22G48-100-조효소 Q10	13892
PACA5g48-배지	11727
PACA5g48-50-조효소 Q10	8027
PACA5g48-100-조효소 Q10	4942
PACA22G48-배지	8541
PACA22G48-50-조효소 Q10	9537
PACA22G48-100-조효소 Q10	14901

[0917]

표 111

HepG2와 PACA2에서 CTRL에 대한 ATP 시트레이트 리아제의 비율

양 - 조성	정상화된 강도
PACA5g48-배지	1.00
PACA5g48-50-조효소 Q10	0.68
PACA5g48-100-조효소 Q10	0.42
PACA22G48-배지	1.00
PACA22G48-50-조효소 Q10	1.12
PACA22G48-100-조효소 Q10	1.74
Hep5g48-배지	1.00
Hep5g48-50-조효소 Q10	0.85
Hep5g48-100-조효소 Q10	0.79
Hep22G48-배지	1.00
Hep22G48-50-조효소 Q10	1.29
Hep22G48-100-조효소 Q10	2.09

[0918]

[0919] 피루브산 키나제 M2 (PKM2)

[0920]

피루브산 키나제는 해당경로에 연관된 효소이다. 이 효소는 ATP와 피루브산을 생성하기 위해 인산을 포스포이놀 피루베이트(PEP)에서 이인산 아데노신 (ADP)로 운반하는 역할을 한다. PKM2는 해당 피루브산 키나제의 동위효소 이고, 이 효소의 발현은 조직의 대사 가능에 의해 특성화된다. 예를 들어 M2 동위효소는 배아세포와 같이 고 에너지를 필요로 하면서 정상적으로 빠르게 증식하는 세포에서 발현되고 폐와 빠른 속도의 핵산 합성을 요하는 또한 채장도세포와 같이 정상 분화되는 소수의 조직에서 발견된다. PKM2는 세포의 에너지 필요를 충족하기 위한 해당경로에의 의존에 의해 암세포에서 상당히 많이 발현된다. 배아에서는 제한되어있다고 생각되는 PKM2 이소폼 은 암세포에서 재발현된다. PKM2를 발현하는 세포는 락트산 생성 증가와 산화적 인산화 감소를 보이면서 호기성 해당 형질(대사적 형질에서 변화를 보임)을 선호한다. 따라서, 암세포에서 PKM2 발현의 감소는 해당경로를 통한 에너지 생성을 변화시키거나 하향조절할 것이고, 이것은 암 치료에서 유용한 전략이다. 자료는 정상세포와 암세포에서 PKM2의 다양한 발현 패턴을 보여주었고, 암세포가 정상세포에 비교했을 때 발현 수준이 더 높았다. 조효소 Q10으로의 세포 처리는 정상세포와 암세포에서(도면 81-85) PKM2 상한과 하한 밴드 발현 패턴을 변화시킨다. 시험된 암세포에서, PKM2 발현이 용량의존적으로 감소했고 정상세포에서는 중요한 변화가 관찰되지 않았다. 실

험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 112**

HepG2에서 피루베이트 키나제 근육 형태 2 상부 밴드

양 - 조성	정상화된 부피 (24 h)	정상화된 강도 (48 h)
5g-배지	28386	413
5g-50-조효소 Q10	29269	303
5g-100-조효소 Q10	18307	354
22G-배지	25903	659
22G-50-조효소 Q10	22294	562
22G-100-조효소 Q10	19560	601

[0921]

**표 113**

HepG2에서 피루브베이트 키나제 근육 형태 2 하부 밴드 (58KD)

양 - 조성	정상화된 부피(24 h)	정상화된 부피(48 h)
5g-배지	10483	310
5g-50-조효소 Q10	11197	185
5g-100-조효소 Q10	7642	122
22G-배지	9150	306
22G-50-조효소 Q10	6302	344
22G-100-조효소 Q10	6904	465

[0922]

**표 114**

처리 후 HASMC 세포에서의 피루베이트 키나제 근육 형태 2 상부 밴드

양 - 조성	정규화된 강도
5g48-배지	608
5g48-50-조효소 Q10	811
5g48-100-조효소 Q10	611
22G48-배지	516
22G48-50-조효소 Q10	595
22G48-100-조효소 Q10	496
22G24-배지	301
22G24-50-조효소 Q10	477
22G24-100-조효소 Q10	701

[0923]

[0924] 락테이트 데하이드로게나제 (LDH)

[0925] LDH는 NADH와 NAD<sup>+</sup>를 상호변환하면서 피루브산과 락트산의 상호변환을 촉매하는 효소이다. 이 효소는 미토콘드리아의 산화적 인산화로 낮은 세포의 산소분압에서 환원당량 생성과 ATP 발생을 위해 피루브산을 락트산으로 변화시키는 능력이 있다. 암세포는 ATP와 환원당량과 환원적 미토콘드리아 OXPHOS를 생성하기 위한 해당과정의 흐름을 유지하기 위해 통상적으로 LDH의 증가된 발현을 보여준다. 따라서, 암세포에서 LDH 발현을 감소시키는 것은 TCA 회로의 피루브산의 진입을 촉진하기 위해 락트산 생성으로부터 대사를 변화시킬 것이다. 조효소 Q10 처리는 정상세포에는 최소의 영향을 주었고 암세포에서 락테이트 데하이드로게나제 (LDH) 발현을 감소시켰으며 이것은 조효소 Q10이 세포질 피루브산이 락트산으로 변화하는 것을 최소화함으로써 해당작용에서의 ATP 발생을 미토콘드리아 OXPHOS로 근원물질로 변화시키기 위해 암세포 생물 에너지에서의 변화를 야기하는 역할을 한다는 것을 뒷받침한다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

표 115

HepG2에서의 락테이트 데하이드로게나제

양 - 조성	정상화된 부피 (24 h)	정상화된 부피 (48 h)
5g-배지	7981	5997
5g-50-조효소 Q10	7900	5188
5g-100-조효소 Q10	6616	7319
22G-배지	9171	7527
22G-50-조효소 Q10	7550	6173
22G-100-조효소 Q10	7124	9141

[0926]

표 116

2개 실험으로부터 % 대조군으로서 HepG2에서 락테이트 데하이드로게나제

양 - 조성	대조군 %로서 평균 용적
5g24-배지	1.00
5g24-50-조효소 Q10	0.64
5g24-100-조효소 Q10	1.06
5g48-배지	1.00
5g48-50-조효소 Q10	1.12
5g48-100-조효소 Q10	1.21
22G24-배지	1.00
22G24-50-조효소 Q10	1.21
22G24-100-조효소 Q10	1.44
22G48-배지	1.00
22G48-50-조효소 Q10	0.95
22G48-100-조효소 Q10	0.67

[0927]

표 117

PACA에서 락테이트 데하이드로게나제

양 - 조성	정상화된 부피(24 h)	정상화된 부피(48 h)
5g-배지	2122	2360
5g-50-조효소 Q10	5068	2978
5g-100-조효소 Q10	3675	2396
22G-배지	4499	2332
22G-50-조효소 Q10	10218	2575
22G-100-조효소 Q10	7158	3557

[0928]

[0929]

피루베이트 데하이드로게나제-B (PDH-E1)

[0930]

피루베이트 데하이드로게나제 베타(PDH-E1)는 피루브산을 아세틸 CoA로 변환시키는 피루베이트 데하이드로게나제 복합체(PDC)의 일부인 첫 번째 효소 요소이다. PDH-E1은 PDC 복합체에서 미토콘드리아에서 TCA 회로에 들어가기 위해 피루브산의 아세틸 CoA로의 변화에 본질적인 처음 두 개의 생화학 반응을 수행하는 활성을 나타내기 위해 티아민을 보조인자로 필요로한다. 따라서, 암세포에서의 PDH-E1 발현의 증가와 함께 PKM2와 LDH 발현의 동시 감소는 ATP 생성을 위한 미토콘드리아 OXPHOS를 증가시키는 방향으로 피루브산이 진입률을 증가시킬 것이다. 자료가 정상 세포와 암 세포주에서 PDH-E1 발현에 대해 암세포에서 본 효소의 기저 발현이 정상세포에 비해 감소했음을 보여준다. 조효소 Q10으로의 처리는 정상세포에는 변화를 거의 주지 않고 암세포에서 PDH-E1 단백질 발현의 점진적 증가와 연관있다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

표 118

HepG2에서의 피루베이트 데하이드로게나제 베타

양 - 조성	정상화된 부피(24 h)	정상화된 부피(48 h)
5g-배지	517	100
5g-50-조효소 Q10	921	123
5g-100-조효소 Q10	433	205
22G-배지	484	181
22G-50-조효소 Q10	426	232
22G-100-조효소 Q10	340	456

[0931]

표 119

PACA2 세포에서의 피루베이트 데하이드로게나제 베타

양 - 조성	정상화된 부피(24 h)	정상화된 부피(48 h)
5g-배지	323	375
5g-50-조효소 Q10	492	339
5g-100-조효소 Q10	467	252
22G-배지	572	276
22G-50-조효소 Q10	924	279
22G-100-조효소 Q10	1201	385

[0932]

표 120

처리 후 HASMC에서의 피루베이트 데하이드로게나제 베타

양 - 조성	정상화된 부피
5g48-배지	140
5g48-50-조효소 Q10	147
5g48-100-조효소 Q10	147
22G48-배지	174
22G48-50-조효소 Q10	149
22G48-100-조효소 Q10	123
22G24-배지	140
22G24-50-조효소 Q10	145
22G24-100-조효소 Q10	150

[0933]

[0934] 카스파아제 3

[0935] 세포사멸 개시의 조절은 때때로 개시 카스파아제, 카스파아제-2, -9dhk -8/10의 수준에서 행해진다. 세포사멸의 외인성 경로에서, 카스파아제-8은, 활성이 있으면, 직접적으로 카스파아제-3과 같은 종결 카스파아제를 쪼개고 활성화시킨다. 이 활성있는 카스파아제-3은 다른 카스파아제(6, 7, 9) 뿐만 아니라 세포내 관련 표적을 쪼개고 활성화시킨다(예, PARP와 DFF). 이러한 실험에서 암 세포주와 정상 세포주에서 조효소 Q10 반응에 대한 작동 카스파아제-3 단백질 수준이 측정되었다. 세포사멸의 조절이 개시 카스파아제를 통해 이루어졌으나, 많은 신호전달 경로가 대신 작동 카스파아제를 직접 저해함으로써 세포사멸 신호전달을 방해하였다는 사실이 주목할 만 하다. 예를 들어 P38 MAPK는 카스파아제-3을 인산화시키고 이의 활성을 억제한다(Alvarado-Kristensson et al., 2004). 재미있게도, 동일 실험에서 단백질 인산염(PP2A)의 활성 또는 단백질 키나제 C 텔타(PKC 텔타) (Voss et al., 2005)는 카스파아제-3 활성을 증가시키기 위해 p38 MAPK의 효과에 대응하고 세포사멸 신호 전달을 강화할 수 있다. 따라서, 활성화 또는 활성화 후 카스파아제-3 수준에서의 일이 어떤 경우에서 세포의 존망을 결정할 수 있다.

[0936] 카스파아제-3은 세포사멸의 진행 과정에서 중요한 역할을 하는 시스테인-아스파르트산 프로테아제이다. 암세포에서 카스파아제 3 수준은 조효소 Q10 처리로 증가되었다. 이와 반대로 정상세포에서 카스파아제-3의 발현은 완하게 감소하였다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.



표 121

PACA2에서의 카스파아제 3

양-조성	정상화된 부피(24 h)	정상화된 부피(48 h)
5g-배지	324	300
5g-50-조효소 Q10	325	701
5g-100-조효소 Q10	374	291
22G-배지	344	135
22G-50-조효소 Q10	675	497
22G-100-조효소 Q10	842	559

[0937]

표 122

2개 실험으로부터 대조군 %로서 HepG2 세포에서 카스파제 3

양 - 조성	대조군의 %로서 정상화된 부피
5g24-배지	1.00
5g24-50-조효소 Q10	1.08
5g24-100-조효소 Q10	1.76
5g48-배지	1.00
5g48-50-조효소 Q10	1.44
5g48-100-조효소 Q10	0.95
22G24-배지	1.00
22G24-50-조효소 Q10	1.39
22G24-100-조효소 Q10	1.78
22G48-배지	1.00
22G48-50-조효소 Q10	1.50
22G48-100-조효소 Q10	1.45

[0938]

표 123

처리 후 HASMC에서의 카스파아제 3

양 - 조성	정상화된 부피
5g48-배지	658
5g48-50-조효소 Q10	766
5g48-100-조효소 Q10	669
22G48-배지	846
22G48-50-조효소 Q10	639
22G48-100-조효소 Q10	624
22G24-배지	982
22G24-50-조효소 Q10	835
22G24-100-조효소 Q10	865

[0939]

[0940] **숙신산 데하이드로게나제 (SDH)**

[0941] 숙신산 조효소 Q 환원효소로도 알려진 숙신산 탈수수효소는 TCA와 전자전달반응 모두에 연관된 내부 미토콘드리아 막의 복합체이다. TCA에서, 이 복합체는 숙신산의 푸마르산으로의 산화와 동시에 유비퀴논의 유비퀴놀로의 환원을 촉매한다(Baysal et al., Science 2000; 그리고 Tomlinson et al., Nature Genetics 2002). SDH B, C, D 하위단위에서의 배선 돌연변이가 가족성 부신경절종 또는 자궁근종을 개시한다고 발견되었다(Baysal et al., Science 2000).

[0942] 조효소 Q10 처리된 암세포의 미토콘드리아 분획에서 SDH 하위단위 B 발현의 특성화를 위해 웨스턴 블롯 분석법이 사용되었다. 그 결과는 조효소 Q10 처리가 세포의 미토콘드리아에서 SDH 단백질 수준을 높이는 데 연관이라고 암시한다. 이러한 결과는 조효소 Q10의 기전 중 하나는 SDHB 같은 미토콘드리아 효소 수준을 증가시킴으로써 세포의 대사를 TCA 회로와 미토콘드리아로 변화시키는 것이다. 실험의 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

**표 124**

**NCIE0808 마이토프렙에서 숙시네이트 데하이드로게나제 B**

조성 - 시간	평균 정상화된 부피
배지	531
50 $\mu$ M 조효소 Q10, 3h	634
100 $\mu$ M 조효소 Q10, 3h	964
50 $\mu$ M 조효소 Q10, 6h	1077
100 $\mu$ M 조효소 Q10, 6h	934

[0943]

[0944] **저산소증 유도 인자 - 1**

[0945] 저산소증 유도 인자(Hif)는 알파와 베타 하위단위로 구성된 전사 인자이다. 산소 정상 상태에서, Hif1 알파 단백질 수준은 매우 낮다. Hif1 알파 단백질 수준은 단백질번역 후 일련의 사건들을 통한 지속적인 분해로 인해 매우 낮다. 해당작용과 산화적 인산화과정사이의 이동은 보통 피루브산의 이화작용적 운명을 결정하는 PDH와 LDH의 두 개의 효소의 상대적 활성에 의해 조절되는 것으로 간주된다. Hif는 LDH 수준을 유도하고 PDK를 자극함으로써 PDH를 억제하는 작용을 통해 중대한 비분기(bifurcation)을 조절한다. 피루브산 대사를 미토콘드리아에서 세포질로 전환시키는 능력 때문에, Hif는 암세포에서 생물에너지의 이동에 대한 중대한 매개체로 간주된다.

[0946] 조효소Q10의 처리는 암세포의 미토콘드리아 분획에서 Hif1 알파 단백질 수준을 감소시킨다. 정상세포의 모든 세포 용해물에서, Hif1알파의 하단밴드가 관찰되고 역시 감소되는 것으로 보인다. 결과들은 아래 표에 정리되었다.

표 125

처리 후 HASMC 세포에서의 Hif1 알파 하부 밴드

양 - 조성	정상화된 부피
5g48-배지	22244
5g48-50-조효소 Q10	21664
5g48-100-조효소 Q10	19540
22G48-배지	14752
22G48-50-조효소 Q10	17496
22G48-100-조효소 Q10	23111
22G24-배지	21073
22G24-50-조효소 Q10	18486
22G24-100-조효소 Q10	17919

[0947]

표 126

처리 후 HepG2에서의 Hif1 알파 상부 밴드

양 - 조성	정상화된 부피
5g24-배지	12186
5g24-50-조효소 Q10	8998
5g24-100-조효소 Q10	9315
5g48-배지	8868
5g48-50-조효소 Q10	8601
5g48-100-조효소 Q10	10192
22G24-배지	11748
22G24-50-조효소 Q10	14089
22G24-100-조효소 Q10	8530
22G48-배지	8695
22G48-50-조효소 Q10	9416
22G48-100-조효소 Q10	5608

[0948]

[0949] 실시예 43: CoQ10을 처리한 정상세포와 암세포에서의 산소 소비 비율 (OCR)과 세포밖의 산성화 (ECAR)의 분석

[0950] 본 예는 세포를 스트레스(즉, 고혈당증, 저산소증, 젖산)가 있거나 없는 상태에서 대표적인 MIM/CoQ10의 epi-전환인자로 처리하였을 때, 정상 생리적 조건에서 정상세포에서 측정되는 대표적인 값인 해당과정/젖산 생합성과 미토콘드리아의 산화성 인산화과정 (ECAR과OCR값으로 측정되는)으로 이동하는 것을 보여준다.

[0951] 출원은 이전 부분에서 암세포에 CoQ10을 처리하는 것은 미토콘드리아의 산화적 인산화과정을 촉진하는 특정 단백질의 발현의 변화와 관련이 있고 해당과정과 젖산 생합성의 수반되는 감소와 관련이 있다는 것을 보여주었다. 본 예는 인-비트로(in-vitro) 실험모델에서 용해된 산소와 세포밖의 pH수준을 측정하는 기계인 SeaHorse XF 분석기를 이용하여 세포주에서 산소 소비 비율 (OCR)을 측정함으로써 얻을 수 있는 미토콘드리아의 산화적 인산화과정의 직접적 수치를 보여준다 (SeaHorse Biosciences Inc, North Billerica, MA).

[0952] 정상 조직을 둘러싸고 있는 세포내의 (세포질의) pH에 비교해 중앙에서의 세포 밖의 미세환경의 pH는 상대적으로

로 산성이다. 종양의 이러한 특징은 세포외기질(ECM)을 침투할 수 있는 능력과, 나중에 아래 사항을 더 조절하는 신호전달 단계를 시작하는 종양의 전이에 대한 특징을 포함하는 다양한 목적을 제공한다.

- [0953] 종양 신생혈관생성
- [0954] 세포주기 회전을 조절하는 중단 매커니즘의 증가된 활성화
- [0955] 면역학적 감시에 대한 세포적 회피 시스템을 가능하게 하는 면역-조절적 매커니즘
- [0956] 당분해과정의 흐름과 젖산 사용에 대한 의존성을 증가시키는 대사적 조절 요소
- [0957] 발암성을 증가시키는 Bcl-2, IAP, EndoG, AIF와 같은 중요 세포사멸적 유전자군의 기능장애
- [0958] 어느 특정한 이론에 얽매이지 않아도, 종양의 세포밖 미세환경의 산성pH는 변경된 해당과정 현상으로부터 증가된 젖산 생산에 따른 종양 세포에서 짜내진 수소 이온의 농도가 증가된 결과이다.
- [0959] 본 실험에서, 정상 세포주에서 OCR과 ECAR을 CoQ10이 있을 때와 없을 때 측정하여 기준치 값을 결정하였다. 정상적으로 영양분이 공급되는 환경에서 정상세포주의 OCR 비율은 다르고 체내에서 세포의 생리학적 역할을 기능을 하는 것으로 관찰되었다.
- [0960] 예를 들어, 한 실험은 사람 성인 피부 섬유아세포 세포주인 비-종양성 세포주 HDFa를 이용하여 수행하였다. 섬유아세포는 주로 세포외기질(ECM) 요소와 조직의 구조적 체계(스트로마 기질)를 형성하는 콜라겐을 합성하고 분비하는 세포이다. 더불어, 섬유아세포는 상처를 치료하고 국부적인 면역조절과 같은 다양한 기능의 조직의 대사로 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 생리적 조건에서, 정상 섬유아세포의 에너지 필요는 해당과정과 산화적 인산화과정-EMC의 합성에 필요한 영양분을 공급하는 해당과정-의 결합을 통해 충족된다.
- [0961] HDFa와는 반대로, HASMC(인간 대동맥 평활근 세포)는 동맥, 정맥, 림프관, 위장관, 호흡기계, 방광 및 기타 흥분수축결합을 하는 능력을 가진 조직들에서 발견된다. HASMC 세포와 같은 평활근이 수축할 수 있는 능력은 ATP로부터 에너지를 필요로 한다. 이러한 조직은 미토콘드리아로부터 ATP를 공급받는 낮은 에너지 모드로부터 ATP를 빠르게 생산하기 위한 해당작용으로의 전환에 의해 에너지가 공급되는 높은 에너지 모드(운동/스트레스 동안)로 전환된다. 따라서 정상 평활근 세포는 정상적인 생리적 환경에서 필요한 에너지를 충족하기 위해 미토콘드리아 OXPHOS와 해당과정을 결합하여 사용한다.
- [0962] 그들의 각각의 생리적 역할의 다름(즉, HDFa와 HASMC)는 SeaHorse XF 분석기를 이용하여 세포주에서 측정된 휴면하고 있는 OCR 값에서 관찰된다. 도면 37과 38은 생리적으로 정상적인 포도당(약 4.6mM)과 고농도 포도당(고혈당) 조건에서 자란 HDFa와HASMC 세포의 OCR을 설명하고 있다.
- [0963] 정상적으로 산소를 공급하고, 5.5mM 포도당이 있으면서, 어떠한 처리도 하지 않은 HDFa에 대한 기준치 OCR 값은 약 40 pmoles/분이다(상기도면 37) 세포를 22mM 포도당에서 유지하면 이 값은 약간 상승한다. 반대로, 5.5mM 포도당이 있는 HASMC 세포의 OCR 값은 약 90 pmoles/분이며, 22mM 포도당에서 40 pmoles/분으로OCR 값은 감소한다. 따라서, 고혈당 조건에서, HDFa와 HASMC간에 다른 반응을 보이고, 더 나아가 그들 각각의 생리적 기질과 기능에 내재하는 차이를 보여주고 있다.
- [0964] 세포에 CoQ10을 처리하는 것은 정상 포도당 조건(5mM)에서 관찰되는 대표적 상태인 OCR의 변화와 관계가 있다. 생리적 반응의 복잡함은 낮은 산소분압에 있을 때 악화된다. 따라서 CoQ10을 처리하는 것은 특정 세포에 있어 원래 생리학적 상태로 돌아가려는 정상세포의 OCR 비율의 변화와 관련되어 있다.
- [0965] 표 127은 HDFa세포에서 CoQ10이 있을 때와 없을 때, 정상산소상태와 저산소상태일 때, 포도당이 5.5mM일 때와 22mM일 때 ECAR값 (mpH/분)을 보여준다. 정상세포에서 CoQ10을 처리하면 ECAR값에 최소한의 영향을 주지만 OCR에는 영향을 주는 것을 관찰할 수 있다. 높은 포도당과 저산소상태에서 CoQ10을 처리하면, 정상산소상태에서 처리하지 않았을 때 관찰되는 값보다 증가된 ECAR을 낮춰주는 것과 관련되어 있다.

표 127

정상산소상태 및 저산소증 상태하에, 5.5mM 및 22mM 글루코스에서 CoQ10 의 부재 및 존재에서 HDFa 세포에서 ECAR 값

처리	정상산소상태 (5.5mM)		저산소증 (5.5mM)		정상산소상태 (22mM)		저산소증 (22mM)	
	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
미처리	5	1.32	5	0.62	5	0.62	9	0.81
50 $\mu$ M 31510	6	1.11	5	0.78	5	0.78	6	0.70
100 $\mu$ M 31510	6	0.76	5	1.19	5	1.19	8	1.07

[0966]

[0967]

표 128에서, HASMC세포에서 측정된 ECAR 기준치 값 (mpH/분)이 HDFa의 기준치 값보다 높은 것을 알 수 있다. 저산소상태로의 유도는 아마도 증가된 해당작용에 대한 이차적인 산성혈증을 유도하는 세포내 저산소증과 관련된 ECAR의 증가를 야기한다.

표 128

정상산소상태 및 저산소증 상태하에, 5.5mM 및 22mM 글루코스에서 CoQ10 의 부재 및 존재에서 HASMC 세포에서 ECAR 값

처리	정상산소상태(5.5 mM)		저산소상태(5.5m M)		정상산소상태(22m M)		저산소상태(22mM)	
	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
미처리	9	2.22	11	2.18	22	2.08	19	1.45
50 $\mu$ M 31510	9	2.13	11	2.54	21	1.72	17	1.60
100 $\mu$ M 31510	9	1.72	13	2.30	22	1.64	17	1.47

[0968]

[0969]

CoQ10처리는 정상산소상태의 정상 포도당 조건에서 관찰되는 값으로 향해가는 저산소상태의 고혈당 조건의 HASMC세포에서 ECAR비율의 하향적 경향과 관련되어 있다. 이러한 자료는 특정세포의 생리적 역할에 대해 내재된 생리적 변수의 존재와 CoQ10을 처리하였을 때 정상으로 향해서 움직이는 비정상 조건에서 (고혈당조건) 관찰되는 변화를 보여준다.

[0970]

반대로, 암세포 (즉, MCF-7, PaCa-2)는 배양에서 유지하기 위한 해당과정 현상 때문에 내재적으로 정상세포에 비해 높은 수준의 포도당에서 배양될 수 있도록 준비되어 있다. CoQ10처리는 OCR 값에서 지속적인 감소를 유발한다. (도면 39와 도면 40)

[0971]

MCF-7과 PaCa-2세포에서 OCR 값에 대한 CoQ10의 영향은 정상적인 HDFa와 HASMC세포에 대한 것과 유사하고, 그 점에서 다양한 반응은 암세포의 각각의 대사적 프로파일에 근거한 치료적 반응을 연상시킨다.

표 129

정상산소상태 및 저산소증 상태하에, 5.5mM 및 22mM 글루코스에서 CoQ10 의 부재 및 존재에서 PaCa-2 세포에서 ECAR 값

처리	정상산소상태 (17mM)		저산소상태(17mM)		정상산소상태 (22mM)		저산소상태(22mM)	
	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM	ECAR	SEM
미처리	21	5.97	16	3.41	24	4.35	36	5.65
50 μM 31510	13	3.08	12	1.66	20	5.15	25	4.58
100 μM 31510	14	2.14	17	2.59	19	3.38	30	5.62

[0972]

[0973]

표 129는 PaCa-2세포에서의 ECAR값을 나타낸다. 정상세포와는 달리, 암세포는 현상적으로 ATP 생성(증가된 해당작용)을 위해 많은 포도당을 사용하도록 준비되어 있고, 이것은 21 mpH/분 이라는 높은 ECAR로 나타난다 (표 129, 정상산소상태의 포도당 17mM의 치료하지 않은 그룹의 ECAR). CoQ10처리는 이러한 조건에서 ECAR비율의 유의한 감소를 만들어내고 아마도 젖산을 생산하는 해당과정의 감소와 연관이 있다. 이러한 세포에서의 OCR의 관련된 감소는 미토콘드리아의 OXPHOS의 증가된 효율과 관련되어 있다.

[0974]

HAEC (정상 인간 대동맥 내피세포), MCF-7(유방암 세포), HepG2 (간암세포) 및 높은 전이성을 가진 PC-3(전립선암 세포) 세포주와 같은 다양한 정상세포와 암세포에서 OCR와 ECAR 값을 비교하였다. (자료를 보이지 않음). 실험한 모든 세포주에서 스트레스(고혈당, 저산소증, 젖산)가 있거나 없는 상태에서 CoQ10의 처리한 것은 정상 생리 조건에서 정상세포에서 관찰되는 대표적인 값인 OCR과 ECAR 값으로 이동하려는 것과 관련이 있다. 따라서, 세포사를 포함한 암세포에 CoQ10을 처리하는 전반적인 효과는 단백질적, 유전자적, 대사적 결과와 함께 해당과정부터 미토콘드리아 OXPHOS까지의 세포적 생물에너지학의 이동에 총체적으로 영향을 주는 후속효과이다.

[0975]

실시예 44: CoQ10 생합성에 대한 빌딩블럭 분자

[0976]

본 예에서는 벤조퀴논 고리의 생합성에 대한 전구물질, 이소프레노이드 반복의 생합성의 전구물질 및 벤조퀴논 고리의 부가물 등과 같은 ("빌딩블럭 요소") CoQ10 생합성의 전구물질이 타겟세포에 각각 혹은 결합하여 들어가서 세포사멸 억제제 Bcl-2의 발현감소나 세포사멸 촉진제 카스파아제-3의 발현증가의 효과를 내는 것을 보여주고 있다. 어떠한 전구체나 그들의 결합은 세포의 증식을 억제하기도 한다. CoQ10 전구체는 CoQ10 투여에 따른 결과와 실질적으로 동일한 결과를 얻을 수 있다는 것을 보여준다.

[0977]

본 실험에 대한 일부 예시적 실험조건은 아래와 같다.

[0978]

Skme1-28 흑색종 세포를 5% FBS와 1X 항생제를 넣은 DMEM/F12 배양액에서 키웠다. 세포를 85% 포화상태까지 키우고 빌딩블럭 요소를 3, 6, 12 및 24시간동안 처리하였다. 세포를 덩어리로 수거하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0979]

실험에 사용한 빌딩블럭 요소로는 L-페닐알라닌, DL-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-티로신, DL-티로신, D-티로신, 4-하이드록시-페닐피루베이트, 페닐아세테이트, 3-메톡시-4-하이드록시만델레이트 (바닐릴만델레이트, VMA), 바닐린산, 4-하이드록시-벤조에이트, 피리독신, 판테놀, 메발론산, 아세틸글리신, 아세틸-CoA, 파네실 및 2,3-디메톡시-5-메틸-p-벤조퀴논 등이다.

[0980]

웨스턴 블롯 분석에서, 세포는 차가운 PBS에 덩어리로 수거되어 용해되고 BCA 단백질 분석을 이용하여 단백질 수준을 정량하였다. 전체 세포 용해물을 4%로딩 12% 리닝 Tris-HCL 겔에 로딩하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 종이로 이동 시킨 후 5%의 우유 Tris버퍼 용액으로 한시간 가량 차단하였다. 단백질에 1차 항체 (Bcl-2와 카스파아제-3)에 밤새 노출시켰다. 니트로셀룰로오스 종이를 피코 케미루미네센트에 5분간 노출시킨 다음 단백질 발현을 기록하였다. 노출 후, 같은 방법으로 액틴을 정량하였다. 이미지J를 이용하여 단백질 수준을 정량하였다. T-테스트를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

[0981]

실험들의 실례적 결과는 아래 정리하였다.

- [0982] L-페닐알라닌 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 키는 고리 구조에 대한 합성기전을 진행하기에 앞서 L-페닐알라닌은 티로신으로 전환된다. 흑색종 세포에서 세포사멸 단백질의 발현의 변화를 정량하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 시험에 사용한 농도는 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M 이다. L-페닐알라닌을 0.4M 페닐알라닌을 포함하고 있는 DMEM/F12 배양액에 추가하였다. 배양액에서의 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M의 L-페닐알라닌의 최종 농도는 각각 0.405 M, 0.425 M, 그리고 0.500 M이 되었다. 이러한 최종 농도를 Skmel-28 세포에 3, 6, 12 및 24시간 동안 항온처리하여 시험하였다. 세포를 80% 포화상태까지 키우고 처리배양액을 추가한 뒤, 위에 언급한 것과 같이 웨스턴 블롯 분석 절차에 따라 세포를 수거하였다. 100  $\mu$ M L-페닐알라닌을 3시간과 12시간 항온처리한 경우, Bcl-2에서 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 5  $\mu$ M L-페닐알라닌에 대해서는, 6시간 항온처리한 경우 Bcl-2에서 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 25  $\mu$ M L-페닐알라닌에 대해서는, 12시간 항온처리한 경우 Bcl-2에서 통계적으로 유의한 감소가 그리고 카스파아제-3에서 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었다. Bcl-2의 통계적으로 유의한 감소는 세포사멸 가능성에 변화가 생긴 것을 의미하며, 카스파아제-3의 통계적으로 유의한 증가는 세포가 세포사멸 과정을 겪고 있는 것을 의미한다. 샘플 크기와 표준편차 때문에 대조군과 비교했을 때 Bcl-2의 감소 트렌드는 항상 관찰되었고 이러한 시간대의 결과는 본 실험에서 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0983] D-페닐알라닌 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 생체에서 활성을 가진 L-페닐알라닌의 화학적 합성형태인 D-페닐알라닌을 L-페닐알라닌에 비교하여 시험하였다. 세개의 농도 (5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M D-페닐알라닌), 6시간 항온처리한 경우 Bcl-2 발현에 유의한 감소가 관찰되었다. 5  $\mu$ M 과 25  $\mu$ M 에 대해서, 3시간 항온처리한 경우 유의한 감소가 관찰되었다. 5  $\mu$ M 과 100  $\mu$ M 에 대해서, 6시간 항온처리한 경우 카스파아제-3 발현에 유의한 증가가 관찰되었다.
- [0984] DL-페닐알라닌 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: DL-페닐알라닌을 L-페닐알라닌에 비교하여 시험하였다. 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M 을 Skmel-28세포에 처리하였다. 항온처리 시간은 3, 6, 12 및 24시간이었다. 3시간 항온처리 후에, 카스파아제-3의 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었다. 24시간 항온처리 후에, Bcl-2의 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 모든 다른 농도와 시간대에서 Bcl-2의 감소 경향과 카스파아제-3의 증가 경향이 관찰되었지만, 본 시험에서는 모두 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0985] L-티로신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: L-티로신은 CoQ10의 키는 고리 구조를 합성하는데 사용되는 빌딩블럭 요소이다. L-티로신에 대한 초기 시험에서는 웨스턴 블롯 분석을 할 수 있는 충분한 단백질 농도를 나타내지 않았다. 본 실험에서 25  $\mu$ M 이하의 농도를 웨스턴 블롯 분석에 시험하였다. L-티로신 디소듐 염 0.398467 M을 포함하는 DMEM/F12 배양액을 사용하였다. 초기 농도는 500 nM, 5  $\mu$ M, 그리고 15  $\mu$ M으로 증가되었다. 12시간 항온처리 후에, 500nM에서 카스파아제-3의 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었다. 24시간 항온처리 후에, 5  $\mu$ M에서 카스파아제-3의 통계적으로 유의한 증가와 Bcl-2의 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 24시간 항온처리 후에, 500  $\mu$ M과 5  $\mu$ M에서도 Bcl-2의 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다.
- [0986] D-티로신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: L-티로신의 화학적 합성형태인 D-티로신을 흑색종 세포에서 세포사멸적 효과를 보이는 L-티로신과 비교하여 시험하였다. L-티로신에 대한 초기 시험에 근거하여, 25  $\mu$ M 이하의 농도를 웨스턴 블롯 분석에 시험하였다. 시험농도는 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 및 15  $\mu$ M이었다. 12시간과 24시간이 지났을 때, 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 D-티로신은 Bcl-2 발현의 감소를 보여줬다. 카스파아제-3는 5  $\mu$ M에서 3, 12, 24시간이 지났을 때 유의하게 증가되었다. 카스파아제-3는 1  $\mu$ M에서 12시간과 24시간이 지났을 때 발현이 증가되었다. 추가로 카스파아제-3는 5  $\mu$ M에서 12시간이 지났을 때에도 발현이 증가되었다.
- [0987] DL-티로신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: L-티로신의 화학적 합성형태인 DL-티로신을 세포에서 세포사멸적 효과를 보이는 L-티로신과 비교하여 시험하였다. 12시간 항온처리 이후, 1  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 Bcl-2의 발현이 통계적으로 감소되었고, 24시간 항온처리 이후 5  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현이 통계적으로 감소되었다. 12시간 항온처리 이후 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 카스파아제-3의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다.
- [0988] 4-하이드록시-페닐피루베이트 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 4-하이드록시-페닐피루베이트는 타이로산과 페닐알라닌 아미노산으로부터 생성되며 링 구조 합성에 중요한 역할을 한다. Bcl-2와 카스파아제-3의 발현을 알아보기 위해 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 및 15  $\mu$ M의 농도를 시험하였다. 24시간의 항온처리 이후 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현의 유의한 감소를 관찰하였고, 12시간의 항온처리 이후, 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 카스파아제-3 발현의 유의한 증가를 관찰하였다.
- [0989] 페닐아세테이트 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 페닐아세테이트는 링 구조에 곁사슬을 붙이는 역할을 하는 4-하이드록시-벤조에이트로 전환될 수 있다. 시험 농도는 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 및 15  $\mu$ M 을 사용하였다. 페닐아세테이트

에 대해, 12시간과 24시간의 항온처리 이후 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현의 감소가 있었다. 12시간과 24시간의 항온처리 이후 5  $\mu$ M과 15  $\mu$ M에서 카스파아제-3 발현의 증가가 관찰되었다.

- [0990] 3-메톡시-4-하이드록시만델레이트 (바닐릴만델레이트, VMA)빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: VMA는 CoQ10의 링 구조를 합성하는 추가적인 요소이다. 시험 농도는 100nM, 250nM, 1  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 을 사용하였다. 본 실험에서는 통계적으로 유의한 세포사멸적 효과를 관찰할 수 없었지만, Bcl-2 발현이 감소하는 경향은 관찰하였다.
- [0991] 바닐린산 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 바닐린산은 퀴논 고리 합성에 필요한 전구체로 시험 농도는 550nM, 5  $\mu$ M 및 15  $\mu$ M이었다. Bcl-2와 카스파아제-3 발현을 대해 웨스턴 블롯 분석을 통해 측정하였다. 바닐린산은 24시간 항온처리한 후 500nM과 5  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현을 유의적으로 감소시켰다. 3시간 항온처리한 후 15  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현의 감소가 있었다. 15  $\mu$ M에서 24시간 항온처리하는 경우, 카스파아제-3 발현이 유의적으로 증가하였다.
- [0992] 4-하이드록시-벤조에이트 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 4-하이드록시-벤조에이트는 링 구조에 이소프레노이드 결사슬을 붙이는 역할을 한다. 시험 농도는 500nM, 1  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M이었다. 24시간 항온처리한 후 15  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현의 유의한 감소가 있었다.
- [0993] 4-피리독신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 피리독신은 CoQ10의 퀴논 고리 구조를 합성하는데 필요한 또 다른 전구체 물질이다. 시험 농도는 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M이었다. 세포에서 Bcl-2와 카스파아제-3의 수준을 측정하였다. 24시간 항온처리한 후 피리독신은 흑색종 세포에서 Bcl-2 발현을 유의적으로 감소시켰다.
- [0994] 판테놀 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 판테놀은 CoQ10의 퀴논 고리 구조를 합성하는 역할을 한다. 시험 농도는 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M이었다. 판테놀은 25  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현을 유의적으로 감소시켰다.
- [0995] 메발론산 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 메발론산은 CoQ10 합성에 주요 요소이다. 시험 농도는 500nM, 1  $\mu$ M, 25  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M이었다. 판테놀은 본 실험에서 Bcl-2 발현을 감소시키거나 카스파아제-3 발현을 증가시키지 않았다.
- [0996] 아세틸글리신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: CoQ10을 합성하는 또 다른 방법은 이소프레노이드(결사슬) 합성이다. 아세틸글리신을 추가하면 조효소A를 아세틸-CoA로 전환하고, 아세틸-CoA는 이소프레노이드 합성을 위한 메발로산 기전으로 들어간다. 시험 농도는 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M이었다. 아세틸글리신은 12시간 항온처리 이후 5  $\mu$ M과 25  $\mu$ M에서 Bcl-2 발현을 유의적으로 감소시켰다. 24시간 항온처리 이후 100  $\mu$ M에서도 Bcl-2 발현은 유의적으로 감소하였다.
- [0997] 아세틸-CoA 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 아세틸-CoA는 CoQ10을 합성하는 메발로산 기전에 대한 전구체이다. 시험 농도는 500nM, 1  $\mu$ M, 25  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M이었다. 아세틸-CoA는 본 실험에서 유의적으로 Bcl-2 발현을 감소시키거나 카스파아제-3 발현을 증가시키지 않았다.
- [0998] 파네실과 병행한 L-티로신 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: L-티로신은 CoQ10의 퀴논 고리 구조의 합성에 필요한 전구체 중 한 요소이다. 이전 실험에서 L-페닐알라닌과 L-티로신이 들어있는 배양액에서 L-티로신의 반응을 실험하였다. 이 실험에서 L-페닐알라닌과 L-티로신을 추가하지 않은 배양액에 대한 L-티로신도 살펴보았다. 이 실험에서 사용된 L-티로신의 농도는 500 nM, 5  $\mu$ M, 그리고 15  $\mu$ M이었다. 파네실은 50  $\mu$ M에서 실험되었다. 3시간과 6시간 켜에서 유의한 반응이 관찰되지 않았다.
- [0999] 파네실과 병행한 L-페닐알라닌 빌딩블럭 요소의 웨스턴 블롯 분석: 퀴논 고리 구조의 합성에 필요한 전구체인 L-페닐알라닌은 L-티로신과 L-페닐알라닌이 없는 배양액에 프라네실과 함께 처리하여 실험하였다. Bcl-2와 카스파아제-3의 발현을 분석하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 최종 L-페닐알라닌의 농도는 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M을 사용하였다. 파네실은 50  $\mu$ M을 사용하여 추가하였다. 본 실험에서 아래 표에 설명된 것과 같이 대부분의 농도와 병용한 실험에서 Bcl-1 발현이 감소되는 것을 확인하였다.



표 130

L-페닐알라닌	3 hr		6 hr		12 hr		24 hr	
	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3	Bcl-2	Cas-3
5 $\mu$ M	X							
5 $\mu$ M w/ 파네실							X	X
25 $\mu$ M	X		X					
25 $\mu$ M w/ 파네실	X							X
100 $\mu$ M	X		X				X	
100 $\mu$ M w/ 파네실				X				

[1000]

[1001]

4-하이드록시-벤조에이트와 벤조퀴논의 병용에 대한 세포 증식 분석: 본 실험은 서로 다른 빌딩블록 분자를 병용하여 세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위해 세포 증식 분석을 수행한 결과이다.

[1002]

첫 번째 실험은 4-하이드록시-벤조에이트와 벤조퀴논을 병용한 효과를 살펴보았다. 살아있는 세포에 대해 세포 수를 계산한 후에 세포를 48시간 동안 항온처리하였다. 각 실험군은 대조군과 비교하였으며, 각 병용그룹은 벤조퀴논 처리 대조군과 비교하였다. 화합물은 벤조퀴논 추가에 대해 통계적으로 분석되었다. 다음 표에 세포 수 계산 결과를 요약하였으며 X 표시는 세포수가 통계적으로 감소한 것을 의미한다.

표 131

4-하이드록시	대조군과 비교	화합물 w/o 벤조퀴논에 대한 4-하이드록시와 비교함	벤조퀴논 대조군과 비교함
500 nm	X		
500 nm w/ 벤조 (35 $\mu$ M)	X	X	
500 nm w/ 벤조 (70 $\mu$ M)	X	X	
1 $\mu$ M	X		
1 $\mu$ M w/ 벤조 (35 $\mu$ M)	X	X	
1 $\mu$ M w/ 벤조 (70 $\mu$ M)	X	X	
50 $\mu$ M	X		
50 $\mu$ M w/ 벤조 (35 $\mu$ M)	X		
50 $\mu$ M w/ 벤조 (70 $\mu$ M)	X	X	X

[1003]

[1004]

4-하이드록시-벤조익과 벤조퀴논을 병용한 세포에서 세포수의 유의한 감소가 일어났다. 4-하이드록시-벤조에이트 50  $\mu$ M과 벤조퀴논 70  $\mu$ M을 병용하면, 벤조퀴논 단독으로 처리한 것에 비해 유의한 세포수 감소가 있었다. 이것은 이러한 분자비에 대해 상승적인 효과를 의미한다.

[1005]

추가적인 분자비에 대한 추가 시험을 수행하였다. 첫 번째로 4-하이드록시-벤조익의 농도를 500 nM, 1  $\mu$ M, 그리고 50  $\mu$ M로 실험하였다. 이러한 농도는 2,3-디메톡시-5-메틸-p-벤조퀴논(벤조)과 병용하여 시험되었다. 벤조의 농도는 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M을 실험하였다. 흑색종 세포를 80% 포화상태로 키우고 6웰 플레이트에 웰당 40K 세포 수만큼 나누어 심었다. 세포에 CoQ10, 4-하이드록시벤조에이트, 벤조 그리고 4-하이드록시벤조에이트/벤조 병용을 처리하였다.

[1006]

T-테스트를  $p < 0.05$ 를 통계적 유의성으로 삼고 수행하였다. X 표시는 세포수가 통계적으로 감소한 것을

의미한다.

표 132

대조군 vs 벤조 25 $\mu$ M	X
대조군 vs 벤조 (B) 50 $\mu$ M	
대조군 vs 벤조 (B) 100 $\mu$ M	X
대조군 vs 4-하이드록시벤조에이트 (HB) 500 nm	X
대조군 vs HB 1 $\mu$ M	X
대조군 vs HB 50 $\mu$ M	X
500 nM HB vs 500 nM HB w/ 25 B	X
500 nM HB vs 500 nM HB w/ 50 B	X
500 nM HB vs 500 nM HB w/ 100 B	X
1 $\mu$ M HB vs 1 $\mu$ M HB w/ 25 B	X
1 $\mu$ M HB vs 1 $\mu$ M HB w/ 50 B	X
1 $\mu$ M HB vs 1 $\mu$ M HB w/ 100 B	
50 $\mu$ M HB vs 50 $\mu$ M HB w/ 25 B	X
50 $\mu$ M HB vs 50 $\mu$ M HB w/ 50 B	X
50 $\mu$ M HB vs 50 $\mu$ M HB w/ 100 B	
500 nM HB w/ 25 B vs 25 B	X
500 nM HB w/ 50 B vs 50 B	X
500 nM HB w/ 100 B vs 100 B	X
1 $\mu$ M HB w/ 25 B vs 25 B	X
1 $\mu$ M HB w/ 50 B vs 50 B	X
1 $\mu$ M HB w/ 100 B vs 100 B	
50 $\mu$ M HB w/ 25 B vs 25 B	X
50 $\mu$ M HB w/ 50 B vs 50 B	X
50 $\mu$ M HB w/ 100 B vs 100 B	

[1007]

[1008] HB를 포함하는 배양액을 처리하면 세포의 증식이 유의하게 감소한다. 더구나 HB와 벤조퀴논을 병용처리하면 벤조퀴논만 단독으로 처리한 농도군과 비교하여 세포수가 유의하게 감소한다.

[1009] 신생아 섬유아세포에 대해 세포 증식 분석을 수행하였다. 처리한 HB 농도는 500 nM, 5  $\mu$ M, 그리고 25  $\mu$ M이다. HB와 병용하여 벤조퀴논을 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 그리고 100  $\mu$ M 농도로 처리하였다. 흑색종 세포를 웰당 40K 세포수로 심은 후에 24시간 동안 처리하였다. 세포에 트립신을 처리하고 콜터카운터로 세포수를 정량하였다.

[1010] 섬유아세포에서는 통계분석결과 유의한 감소를 보여주지 않았다. 이것은 정상 세포에서 독성이 최소이거나 아예 없다는 것을 나타낸다.

[1011] 페닐아세테이트와 벤조퀴논의 병용에 대한 세포 증식 분석: 페닐아세테이트는 4-하이드록시-벤조익산(링 구조의 불임을 촉진한다)의 합성을 위한 전구체이다. 페닐아세테이트를 CoQ10과 벤토퀴논과 함께 병용하여 항온처리하였을 때의 영향을 분석하기 위해 세포 증식 분석을 수행하였다.

표 133

대조군 및 25/25 $\mu$ M Ben	X
대조군 및 25/50 $\mu$ M Ben	X
대조군 및 25/100 $\mu$ M Ben	X
대조군 및 25/25 $\mu$ M Q-10	X
대조군 및 25/25 $\mu$ M Q-10	X
대조군 및 25/50 $\mu$ M Q-10	X
대조군 및 25/100 $\mu$ M Q-10	X
대조군 및 Ben 25	X
대조군 및 Ben 50	X
대조군 및 Ben 100	X
대조군 및 Q-10 25	
대조군 및 Q-10 50	
대조군 및 Q-10 100	X
Ben 25 $\mu$ M 및 500 nM/25 $\mu$ M Ben	X
Ben 25 $\mu$ M 및 5 nM/25 $\mu$ M Ben	X
Ben 25 $\mu$ M 및 25 nM/25 $\mu$ M Ben	X
Ben 50 $\mu$ M 및 500 nM/50 $\mu$ M Ben	X
Ben 50 $\mu$ M 및 5 nM/50 $\mu$ M Ben	X
Ben 50 $\mu$ M 및 25 nM/50 $\mu$ M Ben	X
Ben 100 $\mu$ M 및 500 nM/100 $\mu$ M Ben	
Ben 100 $\mu$ M 및 5 nM/100 $\mu$ M Ben	
Ben 100 $\mu$ M 및 25 nM/100 $\mu$ M Ben	
Q-10 25 $\mu$ M 및 500 nM/25 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 25 $\mu$ M 및 5 nM/25 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 25 $\mu$ M 및 25 nM/25 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 50 $\mu$ M 및 500 nM/50 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 50 $\mu$ M 및 5 nM/50 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 50 $\mu$ M 및 25 nM/50 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 100 $\mu$ M 및 500 nM/100 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 100 $\mu$ M 및 5 nM/100 $\mu$ M Q-10	X
Q-10 100 $\mu$ M 및 25 nM/100 $\mu$ M Q-10	X

[1012]

[1013]

페닐아세테이트와 벤조퀴논을 병용하였을 때 세포성 증식을 유의하게 감소시켰다. CoQ10과 벤조퀴논을 함께 항온처리 했을 때와 비교해 CoQ10과 페닐아세테이트를 병용하였을 때 유의하게 세포 수를 감소시켰다.

[1014]

4-하이드록시-벤조에이트와 파네실의 병용에 대한 세포 증식 분석: 4-하이드록시-벤조에이트를 파네실과 병용하여 항온처리 시켰다. 결과는 아래 정리하였다. 4-하이드록시벤조에이트 그룹은 대조군과 하르네실 대조군 그룹과 비교하였다. X 표시는 세포수가 통계적으로 감소한 것을 의미한다.

표 134

4-하이드록시 벤조에이트	대조군 대비	w/o 파네실 화합물에 대한 4-하이드록시 대비	파네실 대조군 대비
500 nm	X		
500 nm w/ 파네실 (35 $\mu$ M)	X		
500 nm w/ 파네실 (70 $\mu$ M)	X		
1 $\mu$ m	오류		
1 $\mu$ m w/ 파네실 (35 $\mu$ M)	오류		
1 $\mu$ m w/ 파네실 (70 $\mu$ M)	오류		
50 $\mu$ m	X		
50 $\mu$ m w/ 파네실 (35 $\mu$ M)	X		
50 $\mu$ m w/ 파네실 (70 $\mu$ M)	X		

[1015]

[1016]

L-페닐알라닌과 벤조퀴논의 병용에 대한 세포 증식 분석: L-페닐알라닌과 벤조퀴논의 병용을 시험하기 위해 세포 증식 분석을 수행하였다. L-페닐알라닌을 대조군과 벤조퀴논 대조군과 비교한 결과를 아래 정리하였다. X 표시는 통계적으로 감소한 것을 의미한다.

표 135

L-페닐알라닌	대조군 대비	w/o 벤조퀴논 화합물에 대한 L-페닐알라닌 대비	벤조퀴논 대조군 대비
5 $\mu$ M			
5 $\mu$ m w/ 벤조 (50 $\mu$ M)		X	
5 $\mu$ m w/ 벤조 (100 $\mu$ M)		X	
25 $\mu$ m			
25 $\mu$ m w/ 벤조 (50 $\mu$ M)		X	
25 $\mu$ m w/ 벤조 (100 $\mu$ M)		X	
100 $\mu$ m			
100 $\mu$ m w/ 벤조 (50 $\mu$ M)	X	X	X
100 $\mu$ m w/ 벤조 (100 $\mu$ M)	X	X	X

[1017]

[1018]

L-페닐알라닌과 벤조퀴논을 병용한 것에 대한 유사한 상승적 역할을 관찰하였다.

[1019]

L-페닐알라닌과 파네실의 병용에 대한 세포 증식 분석: L-페닐알라닌을 파네실과 함께 항온처리한 것에 대한 세포 증식에 대한 결과이다. L-페닐알라닌을 대조군과 파네실 대조군 그룹과 비교하였다. X 표시는 세포수가 통계적으로 감소한 것을 의미한다.

표 136

L-페닐알라닌	대조군 대비	w/o 파네실 화합물 에 대한 L-페닐알라 닌 대비	파네실 대조군 대비
5 $\mu$ M			
5 $\mu$ m w/ 파네실 (50 $\mu$ M)			
5 $\mu$ m w/ 파네실 (100 $\mu$ M)			
25 $\mu$ m	X		
25 $\mu$ m w/ 파네실 (50 $\mu$ M)	X	X	X
25 $\mu$ m w/ 파네실 (100 $\mu$ M)	X	X	X
100 $\mu$ m	X		
100 $\mu$ m w/ 파네실 (50 $\mu$ M)	X		X
100 $\mu$ m w/ 파네실 (100 $\mu$ M)	X		

[1020]

[1021]

L-티로신과 벤조퀴논의 병용에 대한 세포 증식 분석: 세포수를 센 뒤 L-티로신을 벤조퀴논과 함께 항온처리하였다. 대조군과 벤조퀴논 대조군 그룹과 비교하였다.

표 137

L-티로신	대조군 대비	w/o 벤조퀴논 화합 물에 대한 L-티로신 대비	벤조퀴논 대조군 대 비
500 nm			
500 nm w/ 벤조 (50 $\mu$ M)			
500 nm w/ 벤조 (100 $\mu$ M)			
5 $\mu$ m	X		
5 $\mu$ m w/ 벤조 (50 $\mu$ M)	X		
5 $\mu$ m w/ 벤조 (100 $\mu$ M)	X		
15 $\mu$ m	X		
15 $\mu$ m w/ 벤조 (50 $\mu$ M)	X		
15 $\mu$ m w/ 벤조 (100 $\mu$ M)	X		

[1022]

[1023]

벤조퀴논의 추가는 L-티로신의 세포수에 대한 효과를 증폭시키지 않는다.

[1024]

L-티로신과 벤조퀴논의 병용에 대한 세포 증식 분석: L-티로신과 파네실의 병용에 대해 점검하였다. 대조군과

파네실 대조군 그룹과 비교하였다.

표 138

L-티로신	대조군 대비	w/o 파네실 화합물 에 대한 L-티로신 대비	파네실 대조군 대비
500 nm			
500 nm w/ 파네실 (50 $\mu$ M)			
500 nm w/ 파네실 (50 $\mu$ M)			
5 $\mu$ m	X		
5 $\mu$ m w/ 파네실 (50 $\mu$ M)	X		
5 $\mu$ m w/ 파네실 (100 $\mu$ M)	X		
15 $\mu$ m	X		
15 $\mu$ m w/ 파네실 (50 $\mu$ M)	X		
15 $\mu$ m w/ 파네실 (100 $\mu$ M)	X		

[1025]

[1026]

L-티로신과 파네실의 병용은 본 실험에서 세포 수를 감소시키는 상승적인 효과를 보이지 않았다.

[1027]

CoQ10의 합성은 2개의 주요 부분으로 나뉘는데, 링 구조를 합성하는 것과 결사슬 구조를 합성하는 것이다. 여기서 중앙학적 세포에 결사슬 합성에 필요한 전구체들과 링 구조 요소를 함께 처리하였다. 본 결과는 링 구조 합성에 관여하는 3개의 주요 요소와 링 구조를 결사슬 구조에 붙이는 역할을 하는 2개의 요소에 집중하였다. Bcl-2의 유의한 감소와 카스파아제-3의 유의한 증가를 보여주는 3가지 요소는 (1) L-페닐알라닌 (2) L-티로신 (3) 4-하이드록시페닐피루베이트이다. 결사슬을 링 구조에 붙이는데 관련된 2가지 요소는 (1) 4-하이드록시벤조에이트와 (2) 페닐아세테이트이다.

[1028]

본 결과는 이러한 요소들을 2,3-디메톡시-5-메틸-p-벤조퀴논(벤조퀴논)과 함께 병용하여 외부에서 처리하였을 때 세포 증식을 유의하게 억제하는 것을 보여준다. 이것은 링 구조와 함께 벤조퀴논 링에 결사슬을 붙이는 요소를 함께 보조하면 손상된 CoQ10 합성기전을 보충할 수 있는 것을 가리킨다. 이것은 또한 분자의 안정화를 원조하여 세포 과정에 의해 요구되는 기능성 성질을 유지시킨다. 페닐아세테이트는 4-하이드록시벤조에이트의 합성을 위한 전구체이고 벤조퀴논과 조합된 외인성 전달은 종양성 세포에서 유사한 효과를 갖는다.

[1029]

실시예 45: 췌장암에 조효소Q10을 처리한 생체내 효과

[1030]

조효소Q10의 정맥주사제형을 동물모델에서 췌장암 치료에 대해 평가하였다. 췌장암이 유도된 흰 쥐를 무작위로 여러 그룹으로 나누었고 아래 9개의 치료군 중 하나를 받아야 한다.

[1031]

그룹 A: 대조군

[1032]

그룹 B: 식염수

[1033]

그룹 C: 매개체

[1034]

그룹 D: 조효소Q10 5mg/kg

[1035]

그룹 E: 조효소Q10 10mg/kg

[1036]

그룹 F: 조효소Q10 25mg/kg

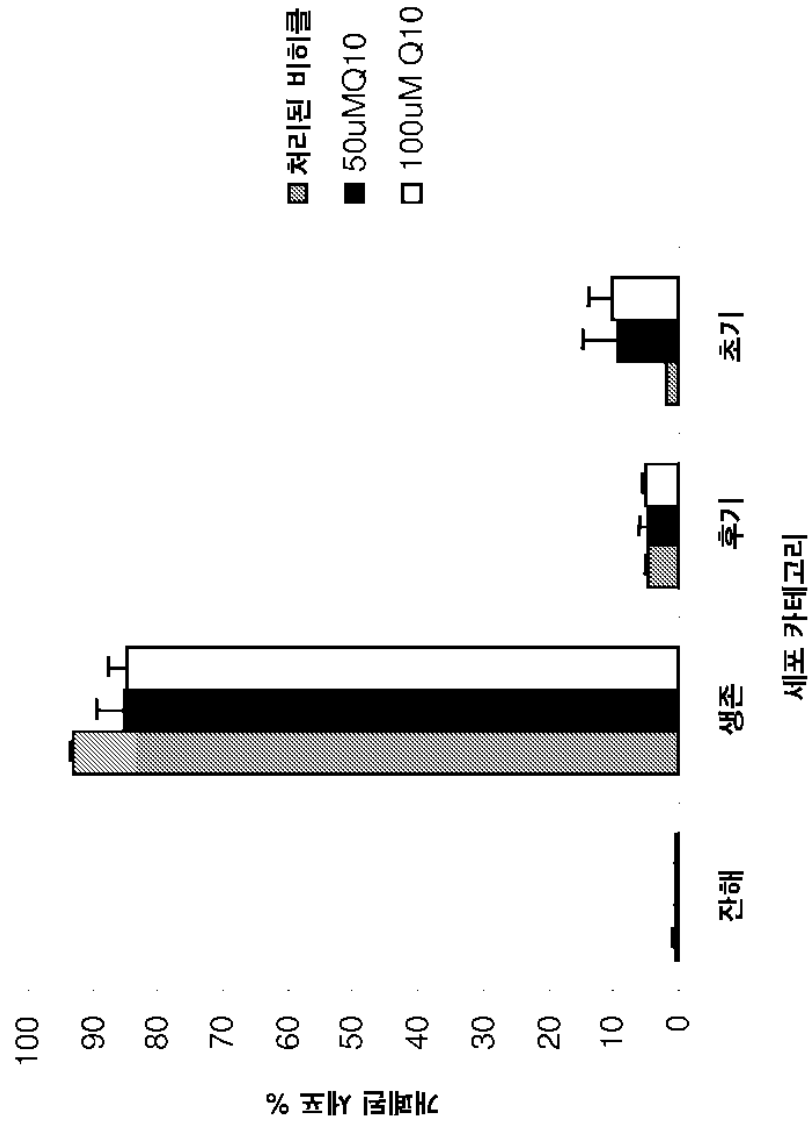
[1037]

그룹 G: 조효소Q10 50mg/kg

- [1038] 그룹 H: 독소루비신 5mg/kg
- [1039] 그룹 I: 조효소Q10 50mg/kg 과 독소루비신 5mg/kg
- [1040] 28일 후, 그룹 A와 B에 있는 모든 동물과 그룹 C에 있는 대다수의 동물은 죽었다. 반대로, 그룹 D, E와 F에 있는 대부분의 동물은 살았으며 보다 높은 용량의 조효소Q10을 받은 동물이 보다 더 오래 살았다. 실제 조효소Q10의 가장 높은 용량을 받은 모든 동물들은 (그룹 G) 28일째에도 모두 살아있었다. 이러한 데이터는 높은 용량을 받은 동물들이 보다 높은 생존율을 보여주는 용량반응곡선을 보여준다.
- [1041] 독소루비신과 병행하여 체장암에 대한 조효소Q10의 효과를 평가하기 위하여 그룹H는 독소루비신 단독으로 그룹 I는 독소루비신과 조효소Q10을 병행하여 처리하였다. 28일 후, 그룹H의 많은 동물들이 독소루비신의 독성 때문에 죽은 반면에 그룹 I의 동물들은 증가된 생존율을 보여줬다. 이러한 데이터는 체장암과 관련된 생존율의 증가와 함께 조효소Q10이 화학요법의 독성적 부작용을 완화시킬 수 있다는 것을 보여준다.
- [1042] 등가 수준
- [1043] 당업자는 본원에 기재된 특정 양태 및 방법에 대한 많은 등가 수준을 과도한 실험 없이 확인할 수 있고 인지할 것이다. 상기 등가 수준은 하기의 청구항 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면  
도면1

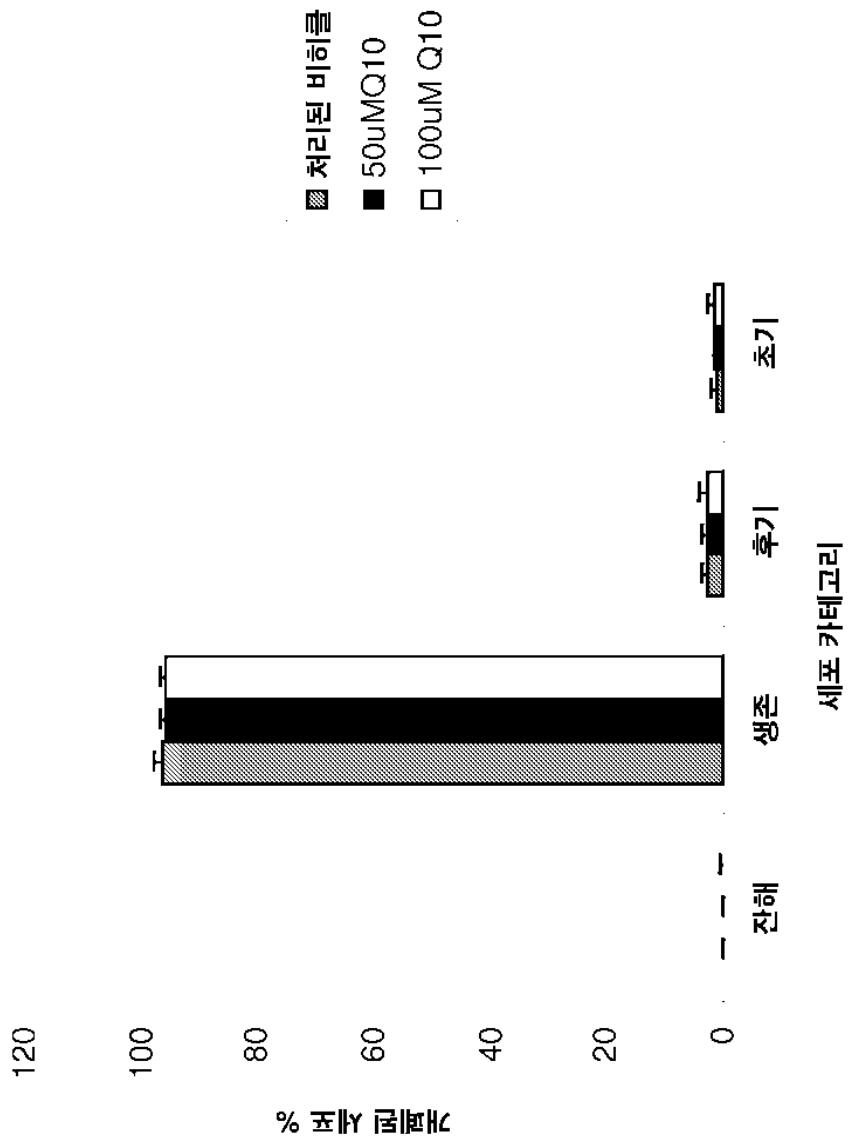
SK-MEL28 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (5000개 세포 분주됨)





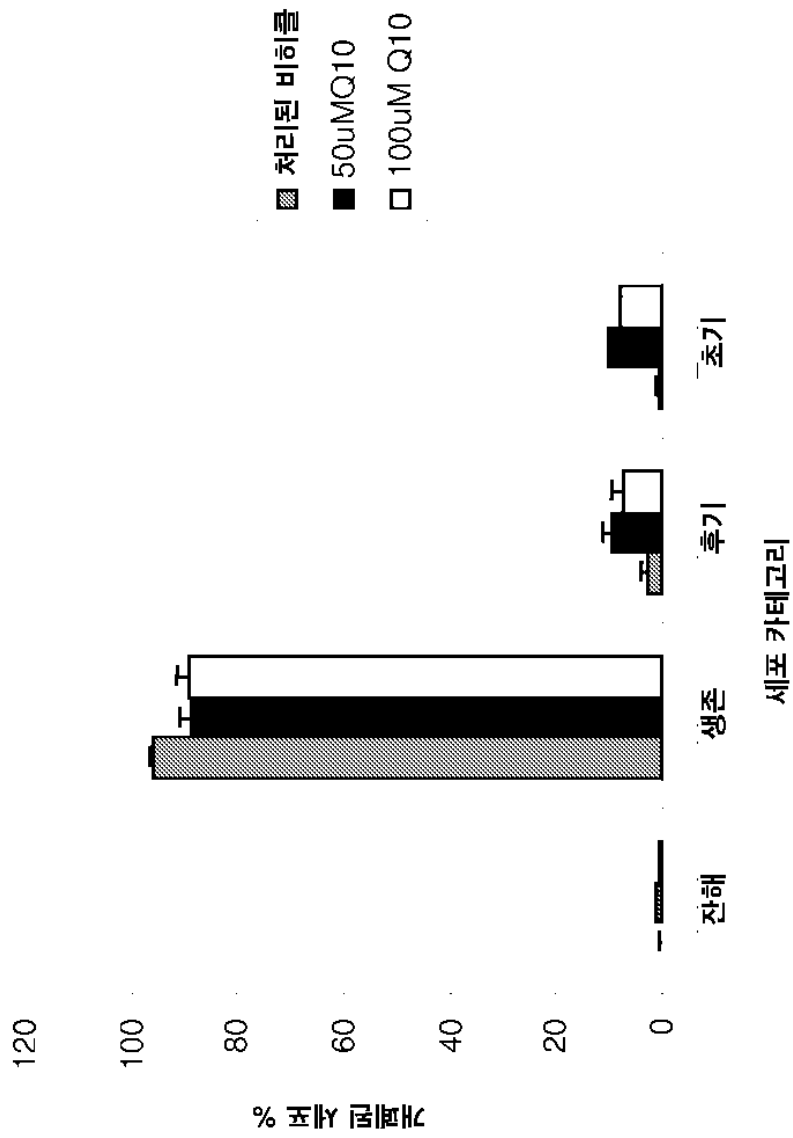
도면2

SKBr3 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (5000개 세포 분주됨)



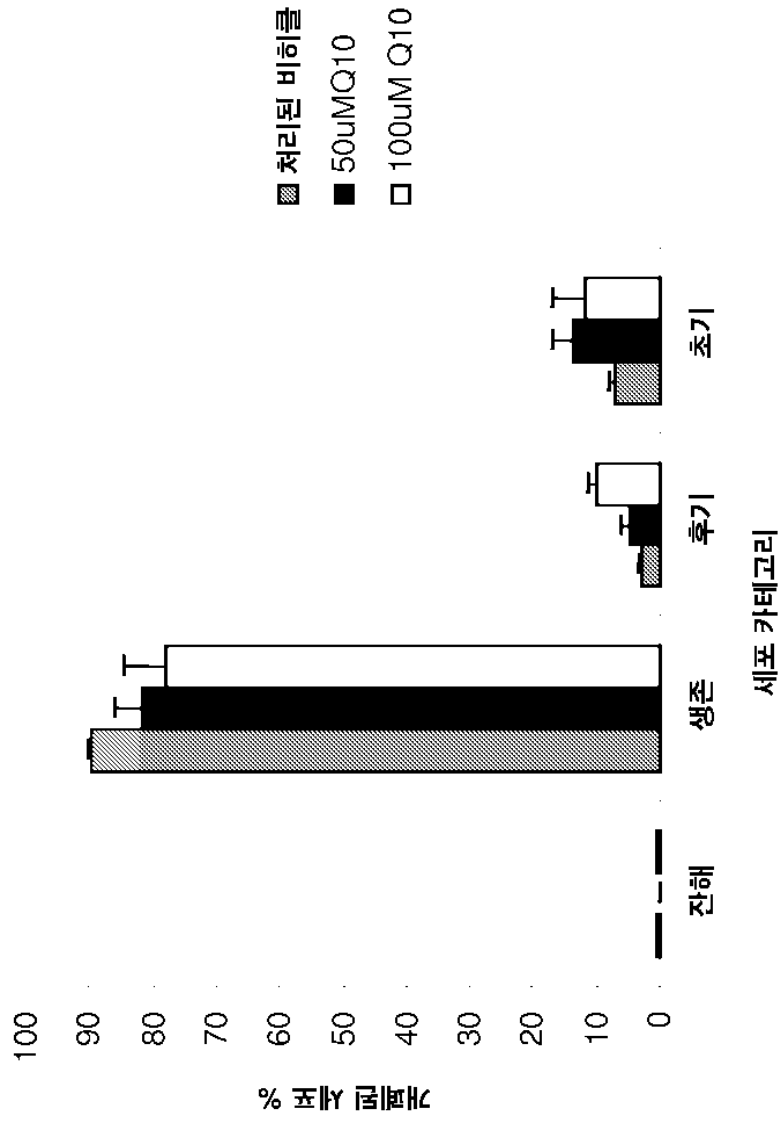
도면3

PaCa2 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (7500개 세포 분주됨)



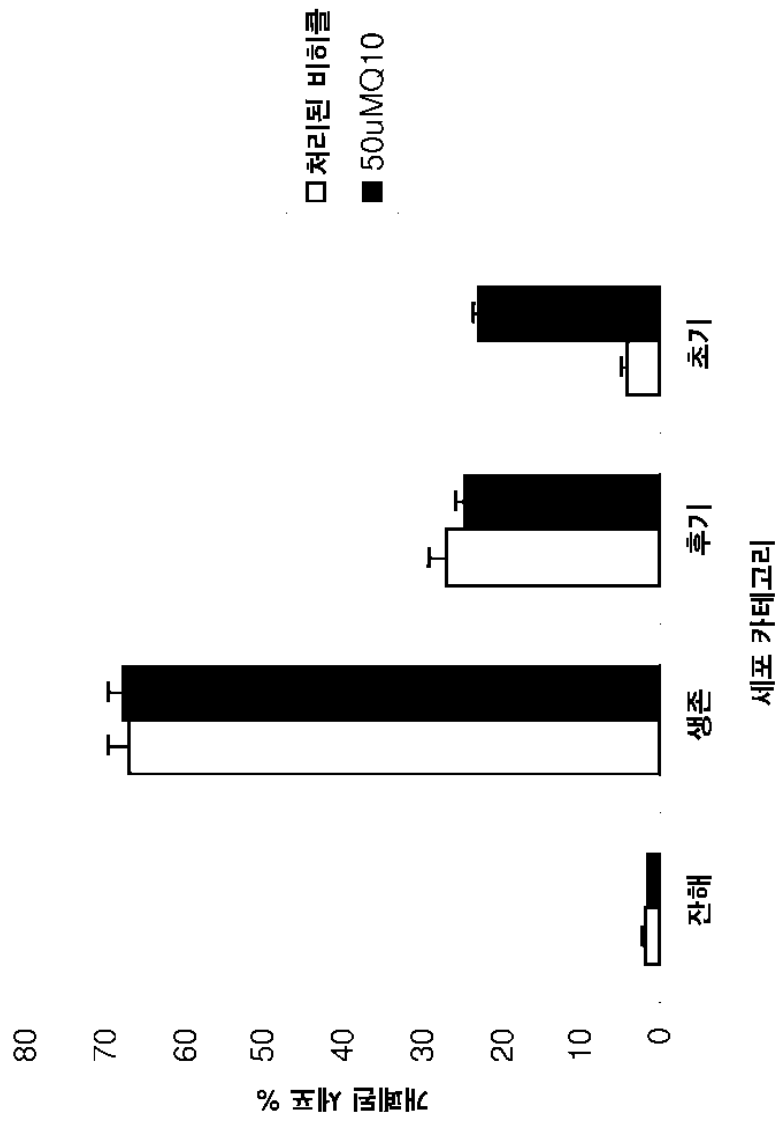
도면4

PC-3 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (5000개 세포 분주됨)



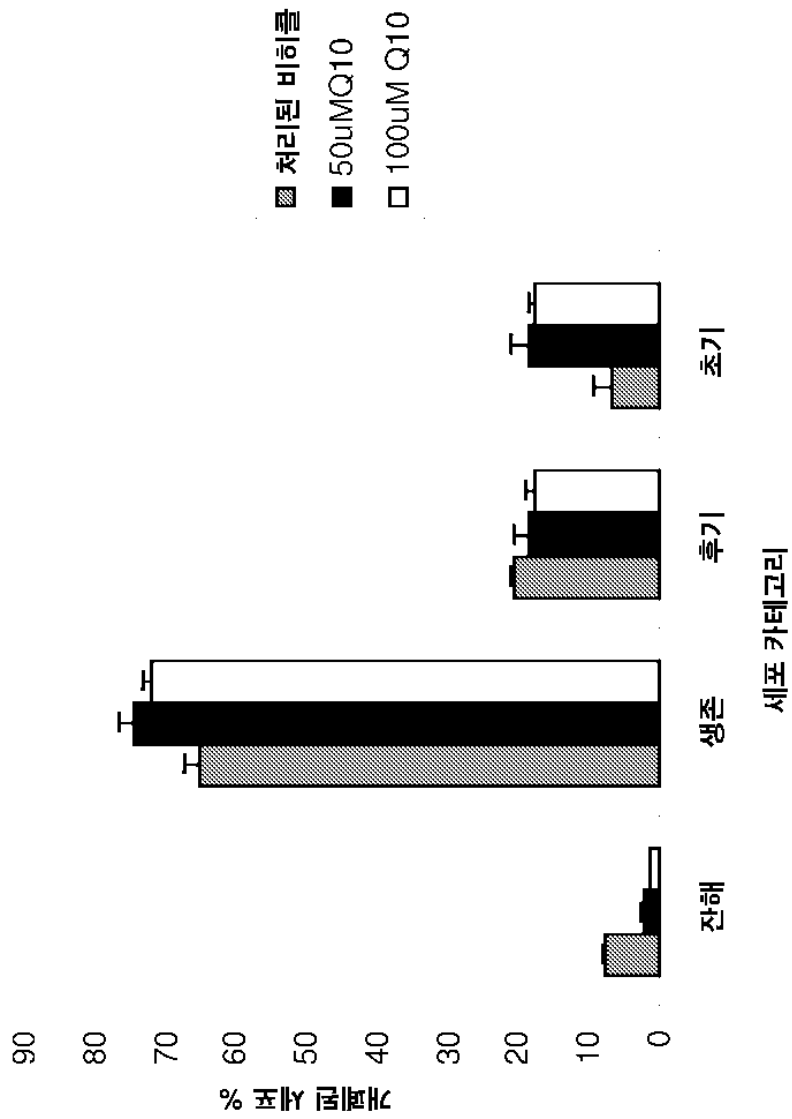
도면5

HepG2 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (7500개 세포 분주됨)

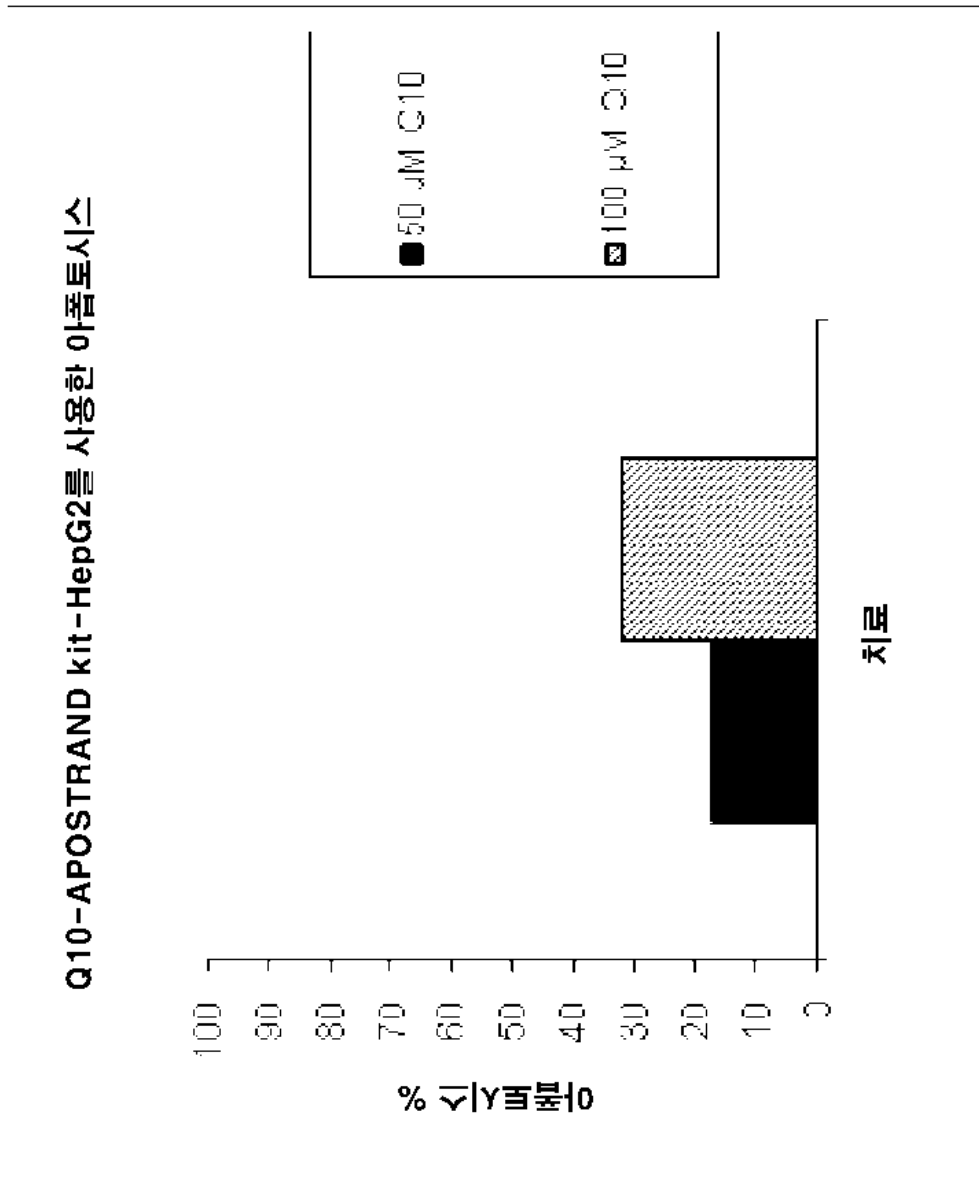


도면6

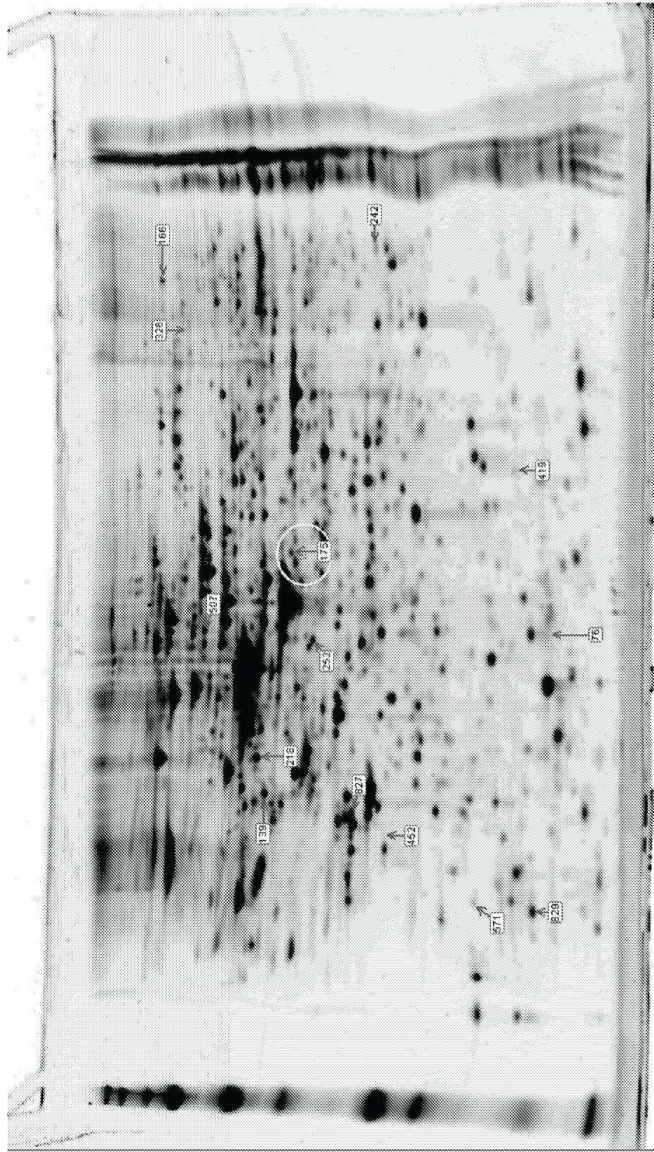
MCF-7 세포-NEXIN 분석에 대한 Q10의 효과 (7500개 세포 분주됨)



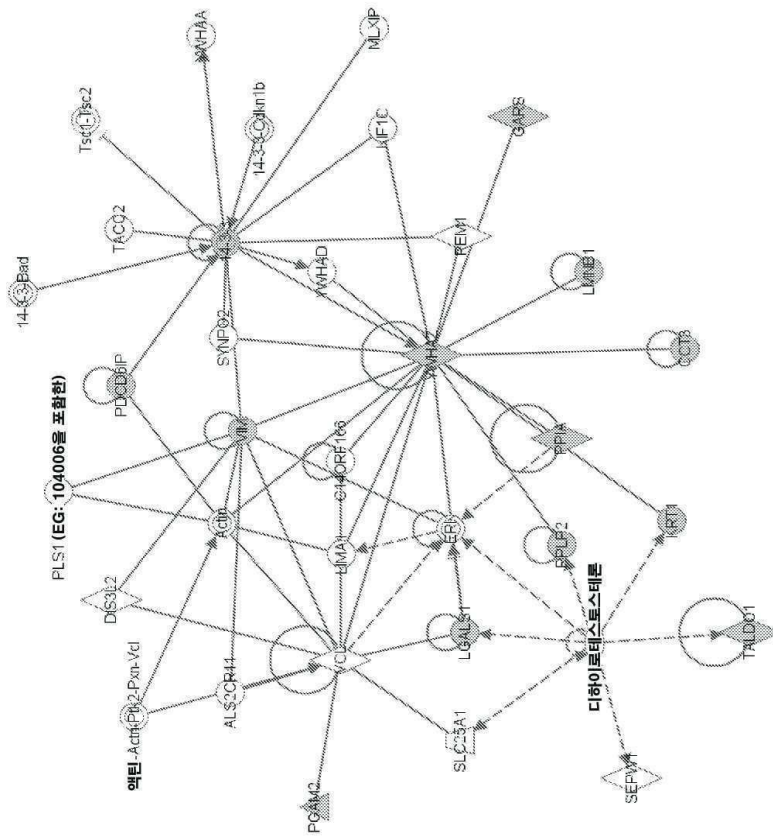
도면7



도면8

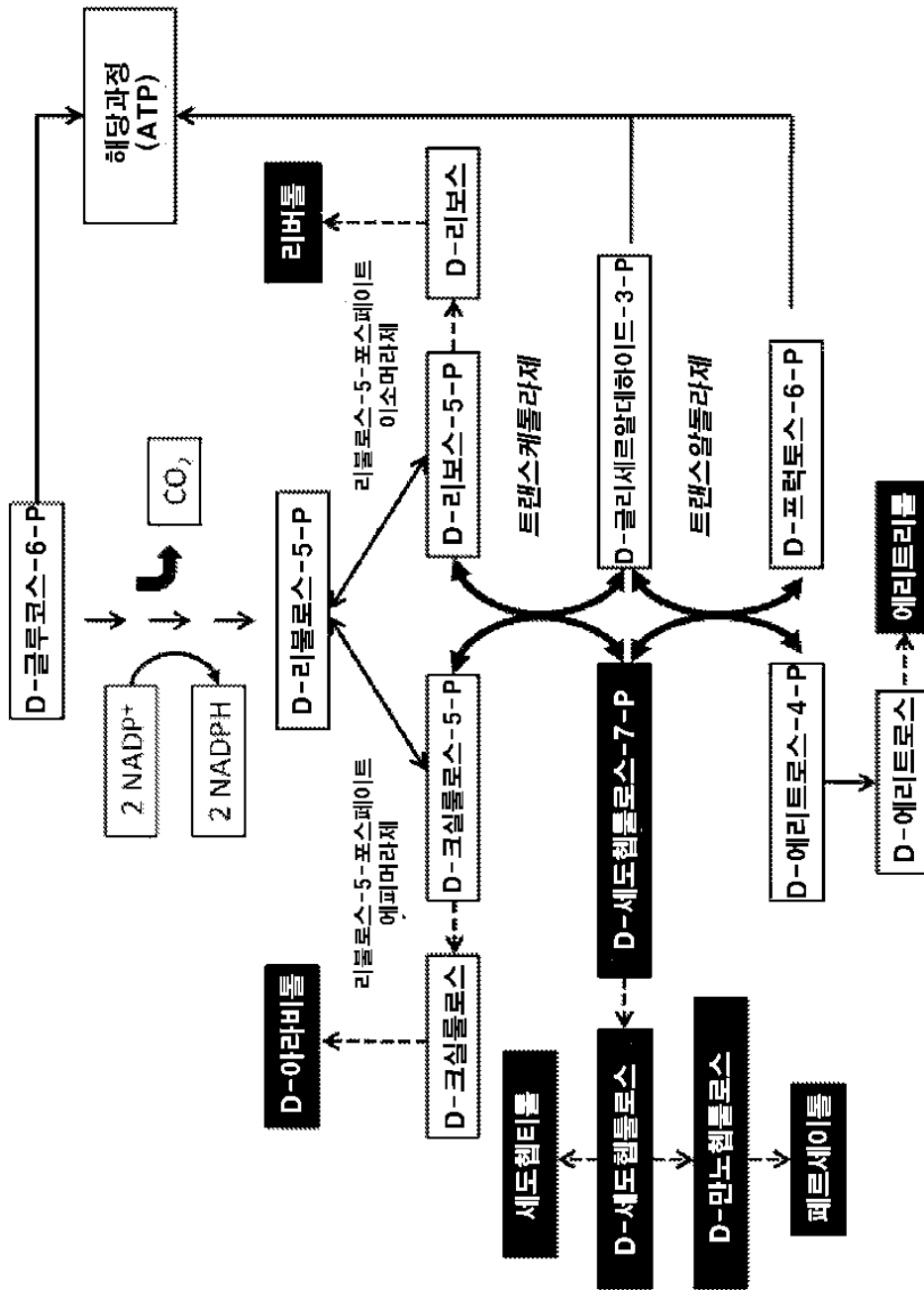


도면9

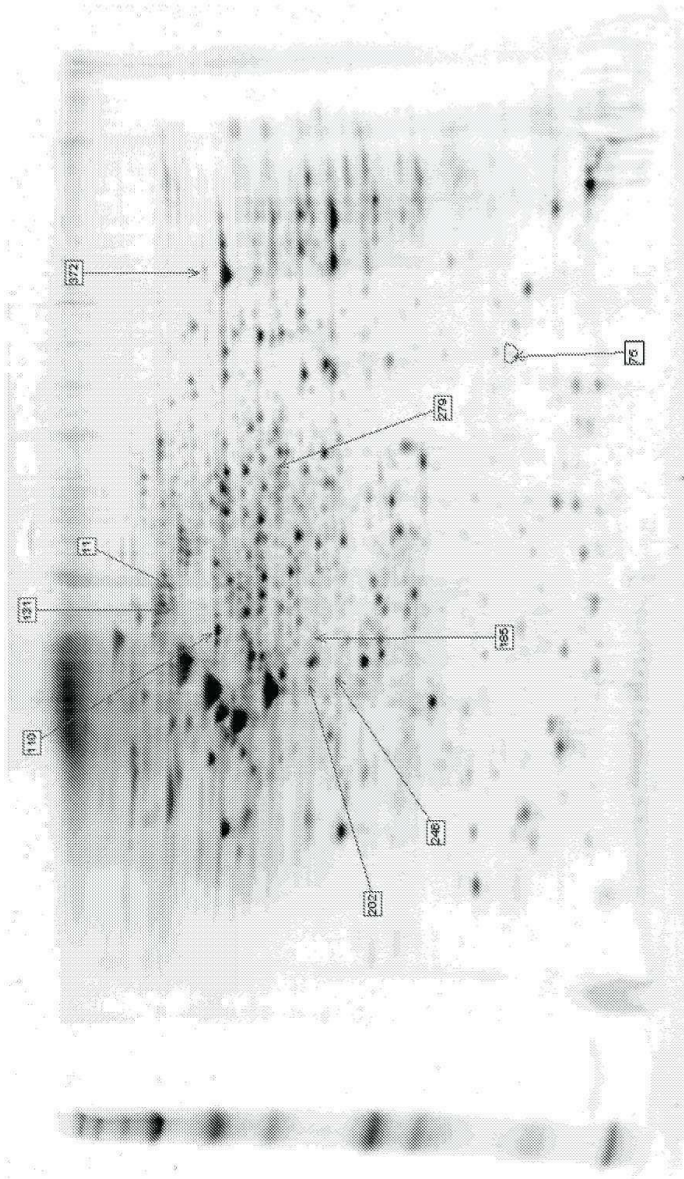




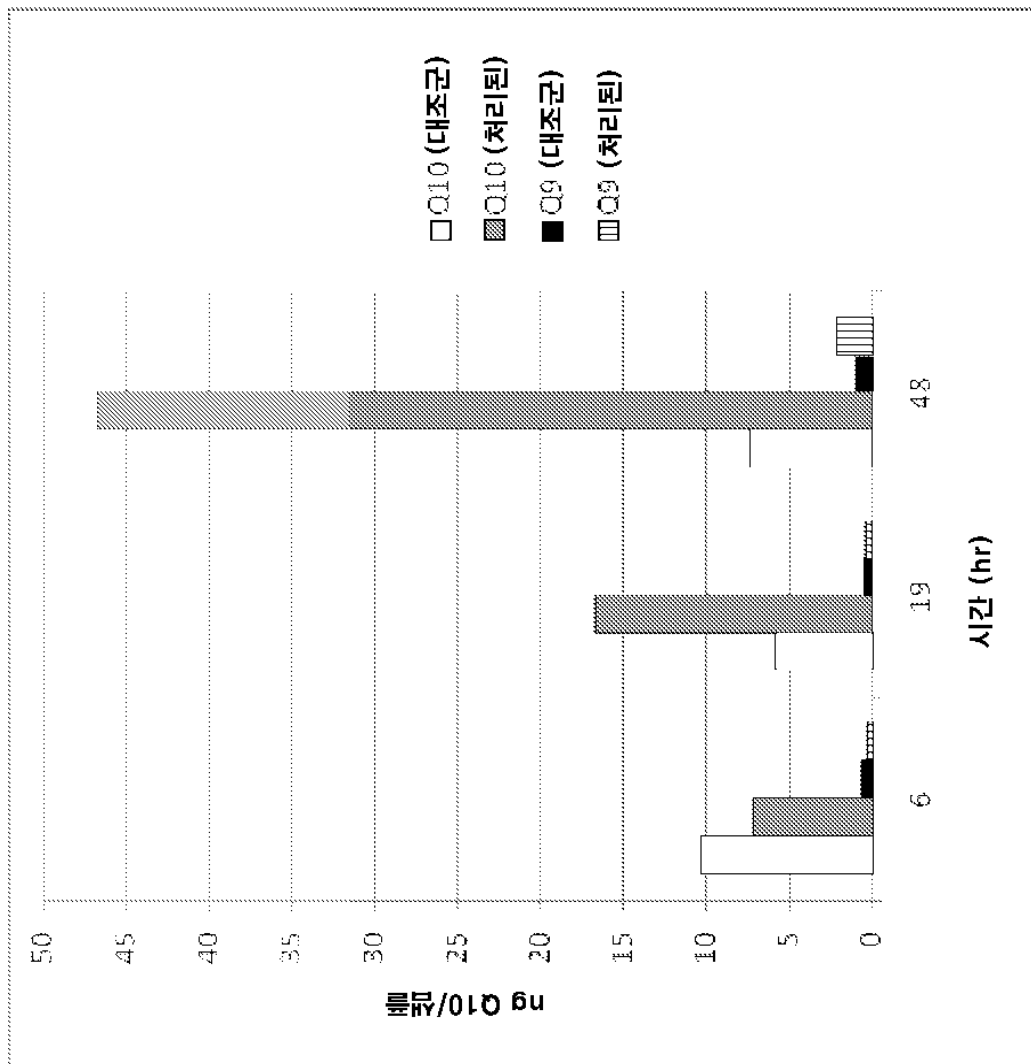
도면10



도면11

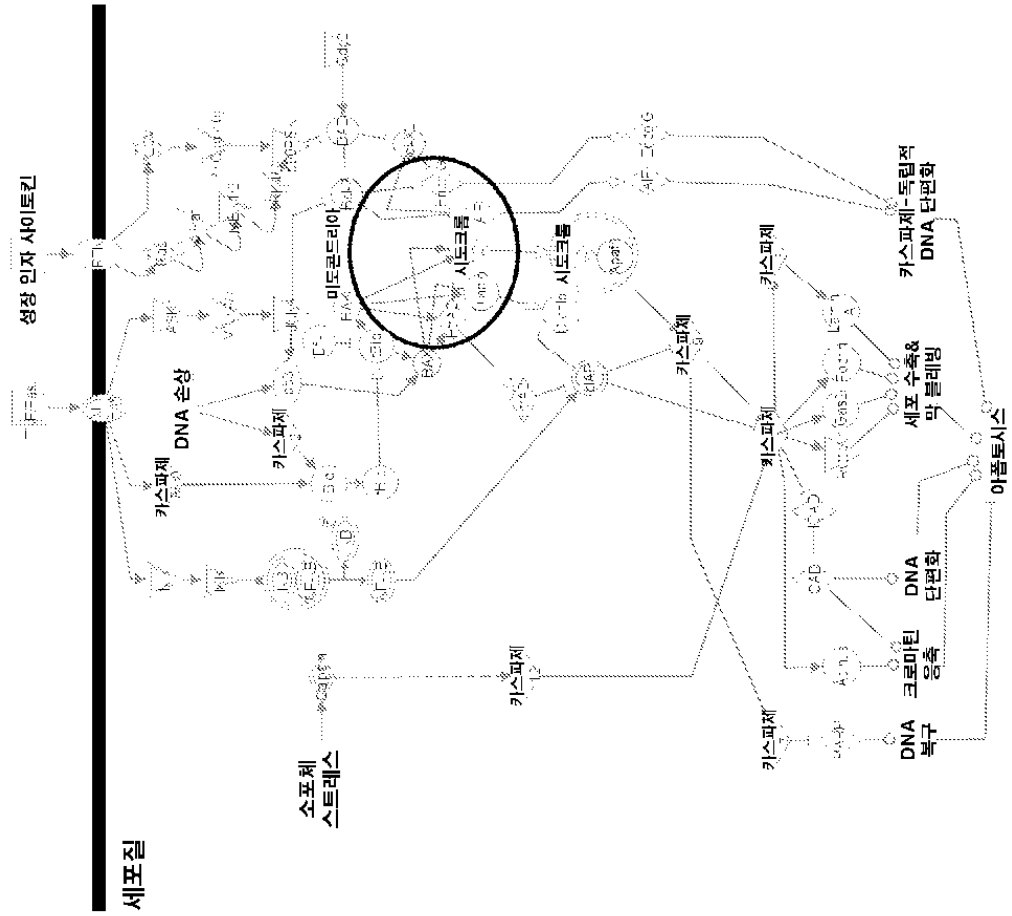


도면12



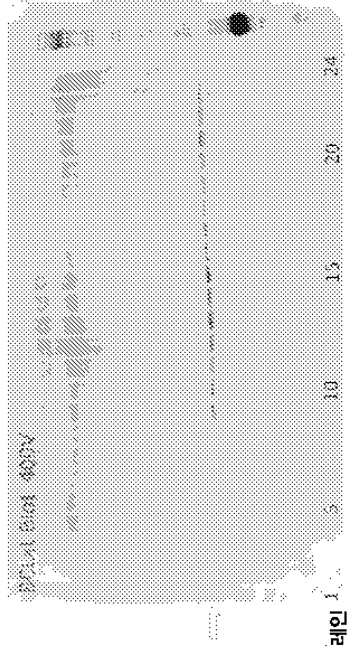
도면13a

아플토티스 시그널 전달

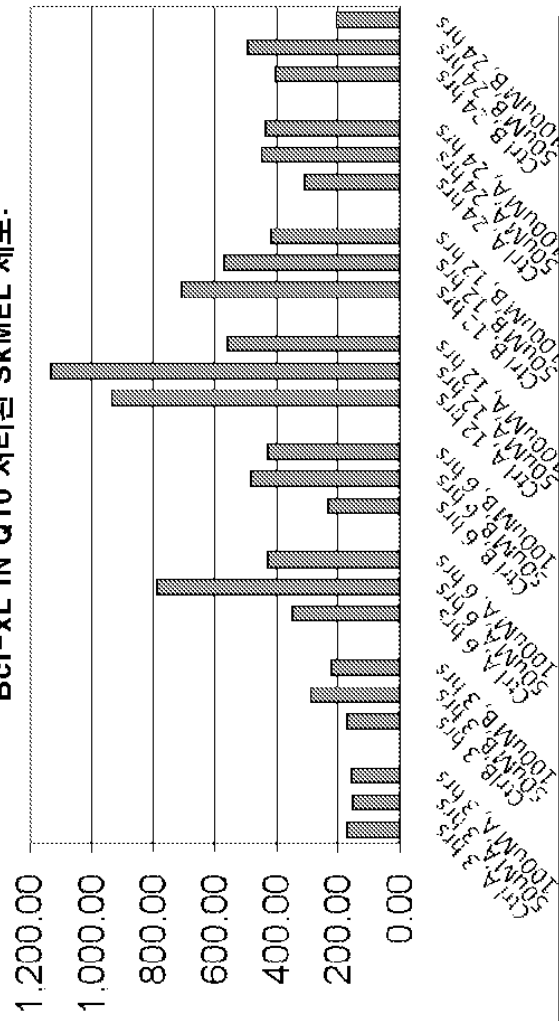




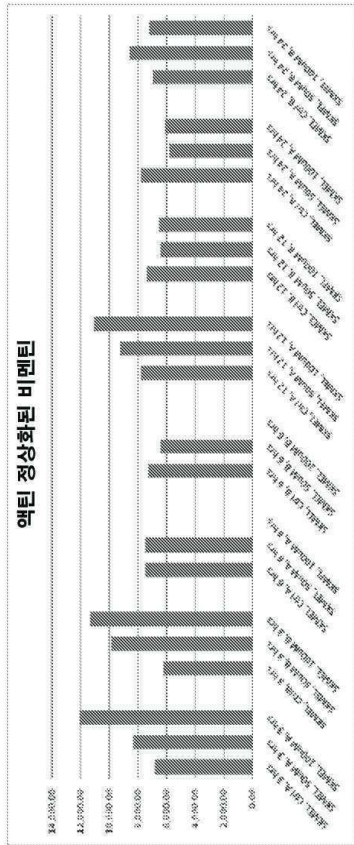
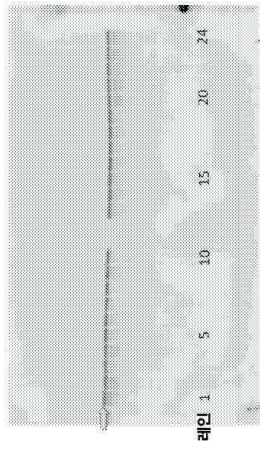
도면14



Bcl-xL IN Q10 처리된 SKMEL 세포:



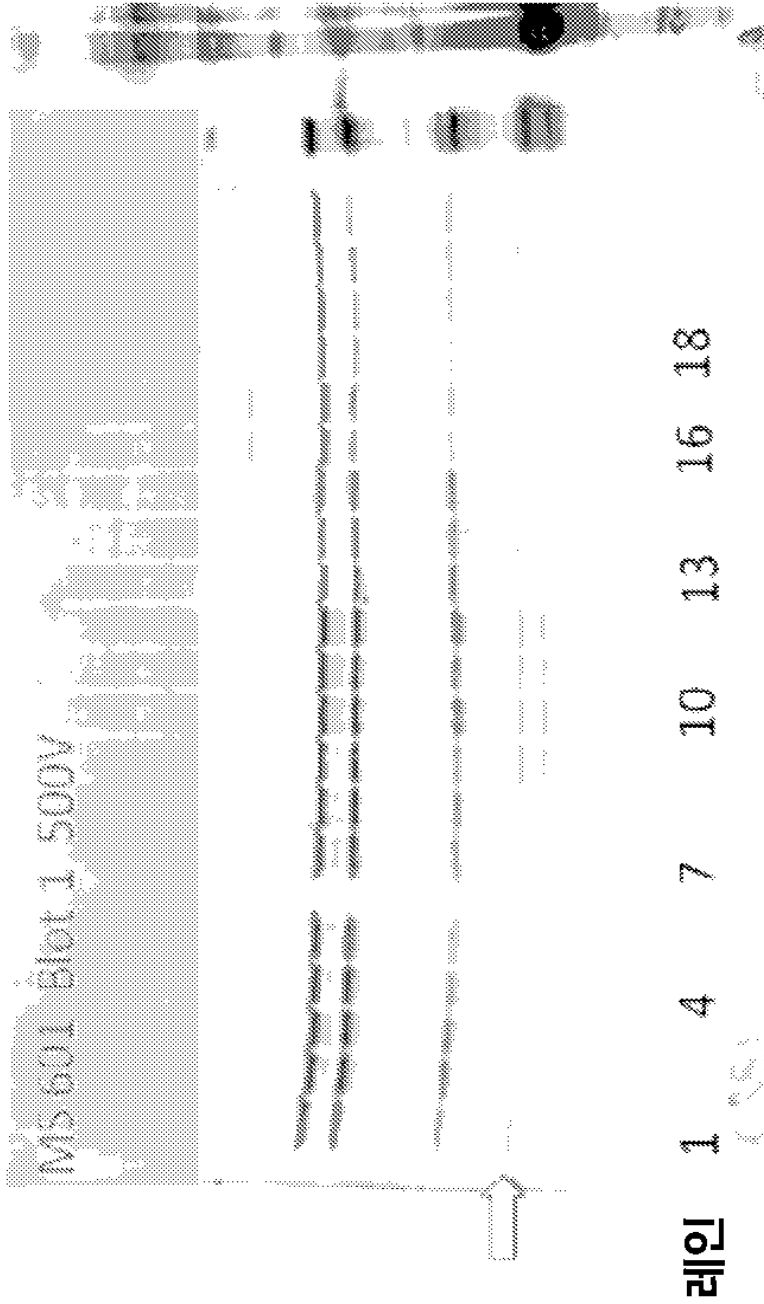
도면15



레인/주요 샘플

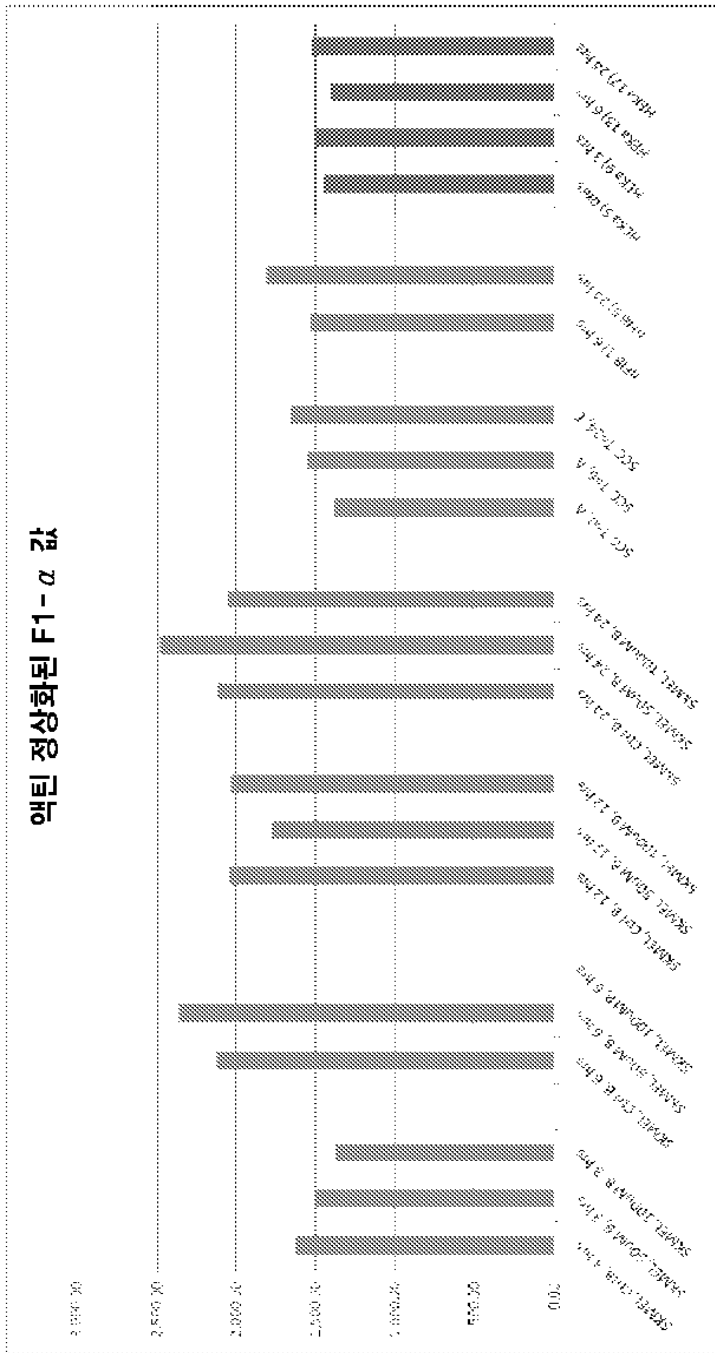
11	0.1A 3.1hr	71	0.1A 6.1hr	131	0.1A 12.1hr	191	0.1A 24.1hr
12	0.1A 3.1hr	72	0.1A 6.1hr	132	0.1A 12.1hr	192	0.1A 24.1hr
13	0.1A 3.1hr	73	0.1A 6.1hr	133	0.1A 12.1hr	193	0.1A 24.1hr
14	0.1A 3.1hr	74	0.1A 6.1hr	134	0.1A 12.1hr	194	0.1A 24.1hr
15	0.1A 3.1hr	75	0.1A 6.1hr	135	0.1A 12.1hr	195	0.1A 24.1hr
16	0.1A 3.1hr	76	0.1A 6.1hr	136	0.1A 12.1hr	196	0.1A 24.1hr
17	0.1A 3.1hr	77	0.1A 6.1hr	137	0.1A 12.1hr	197	0.1A 24.1hr
18	0.1A 3.1hr	78	0.1A 6.1hr	138	0.1A 12.1hr	198	0.1A 24.1hr
19	0.1A 3.1hr	79	0.1A 6.1hr	139	0.1A 12.1hr	199	0.1A 24.1hr
20	0.1A 3.1hr	80	0.1A 6.1hr	140	0.1A 12.1hr	200	0.1A 24.1hr
21	0.1A 3.1hr	81	0.1A 6.1hr	141	0.1A 12.1hr	201	0.1A 24.1hr
22	0.1A 3.1hr	82	0.1A 6.1hr	142	0.1A 12.1hr	202	0.1A 24.1hr
23	0.1A 3.1hr	83	0.1A 6.1hr	143	0.1A 12.1hr	203	0.1A 24.1hr
24	0.1A 3.1hr	84	0.1A 6.1hr	144	0.1A 12.1hr	204	0.1A 24.1hr

도면16



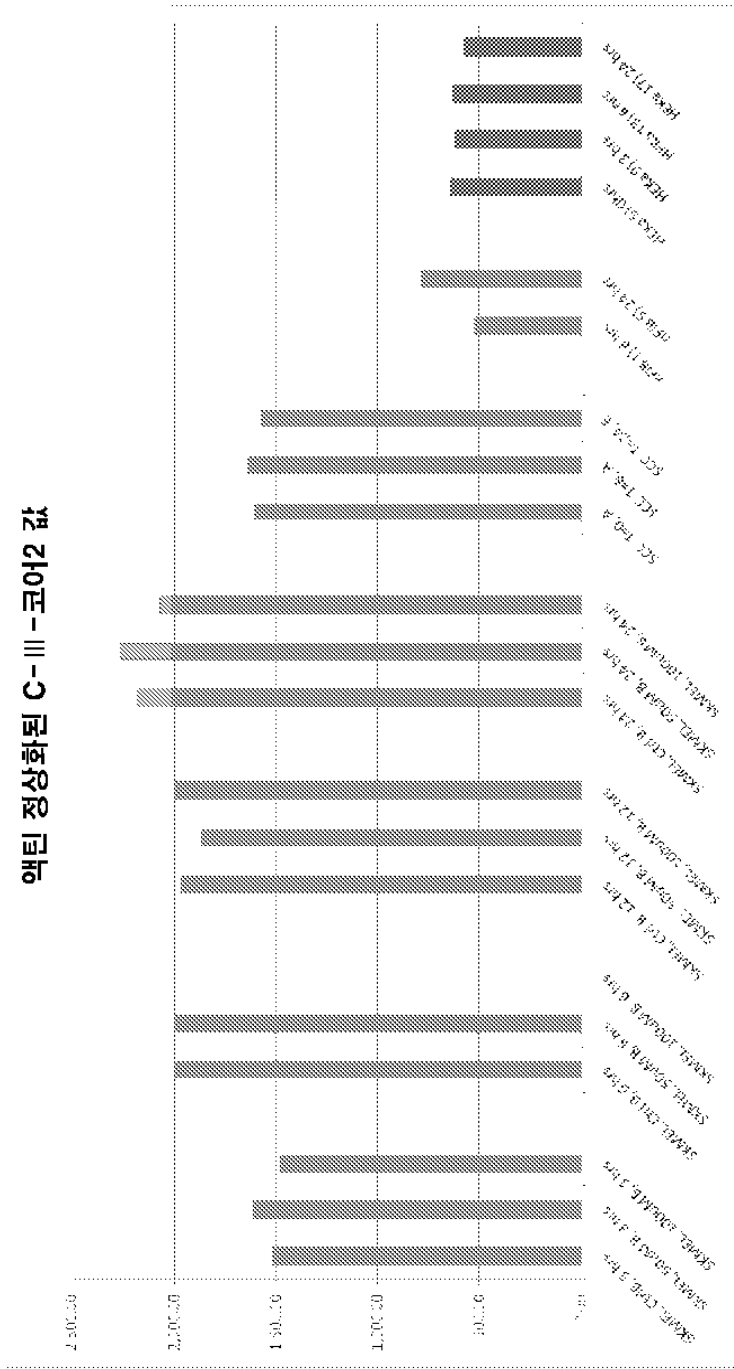


도면17



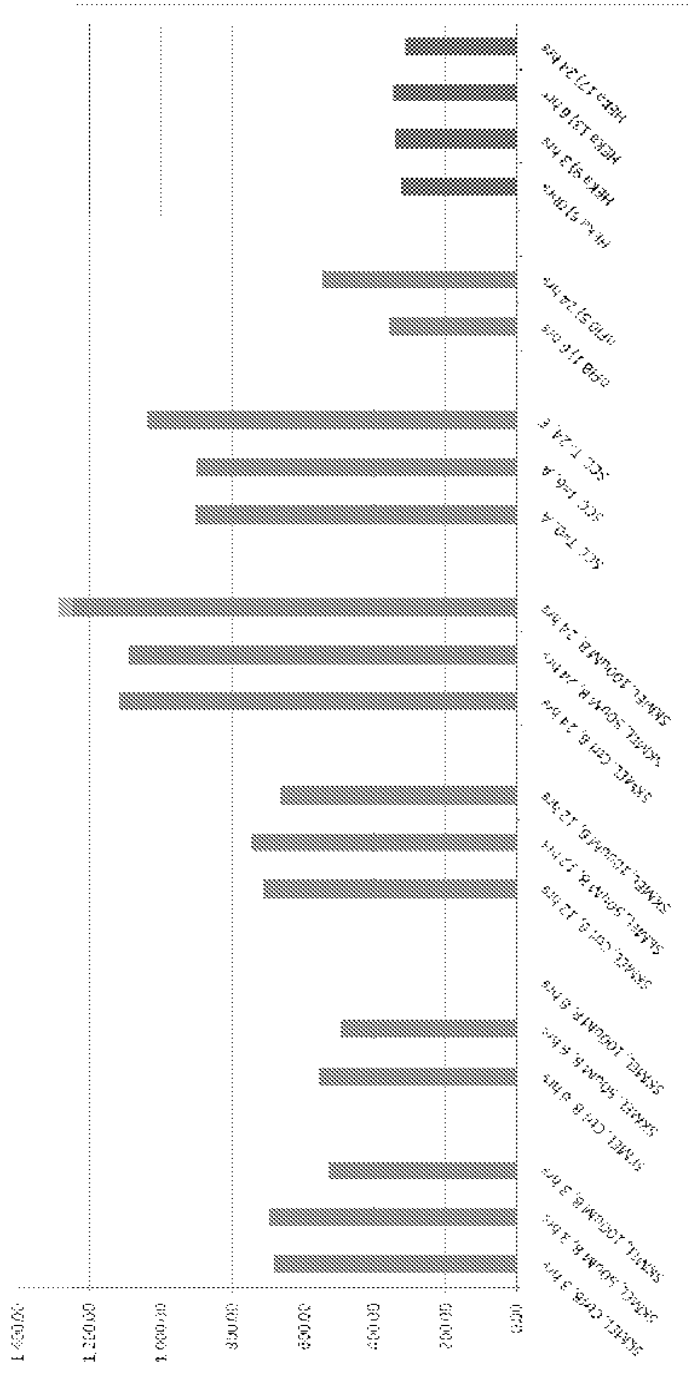
도면18

액틴 정상화된 C-III-코어2 값

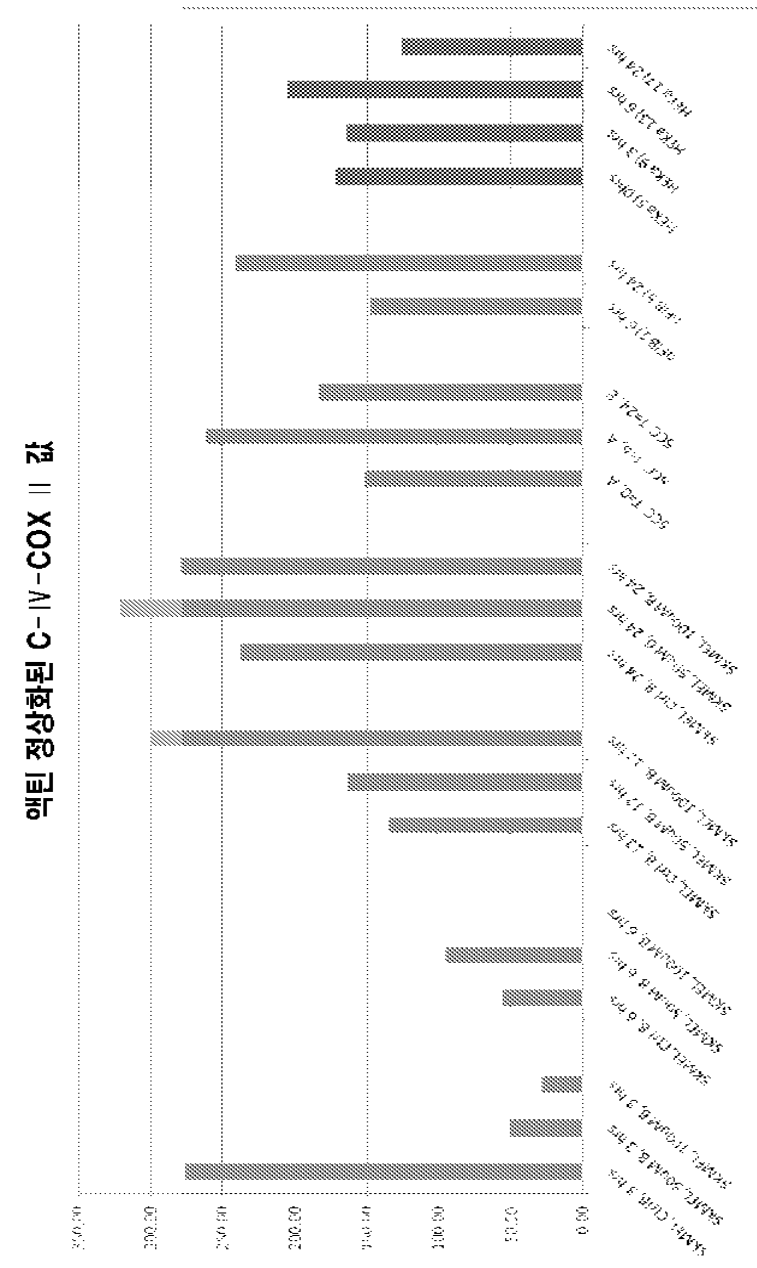


도면19

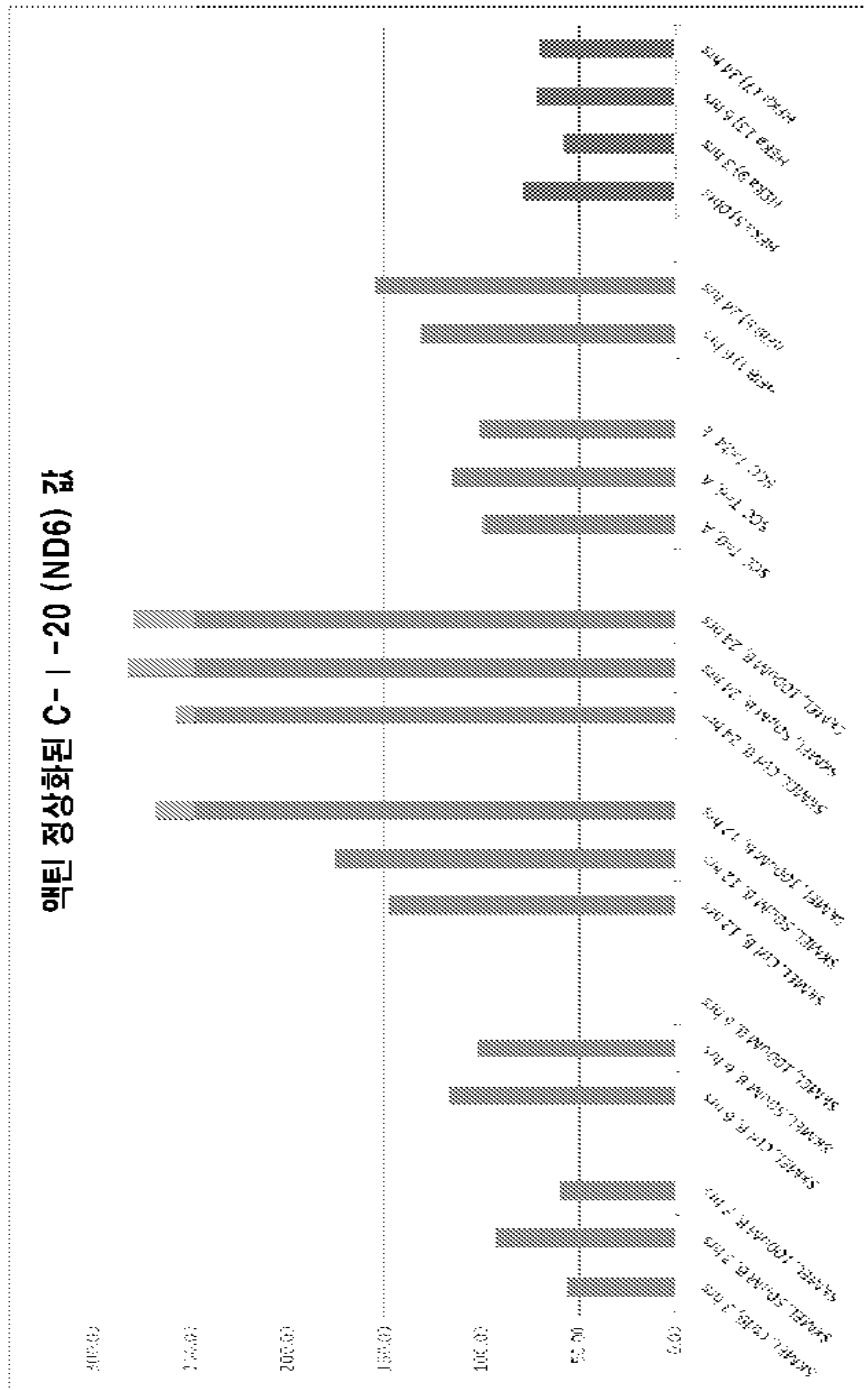
액틴 정상화된 C-II -30 (ND6) 값



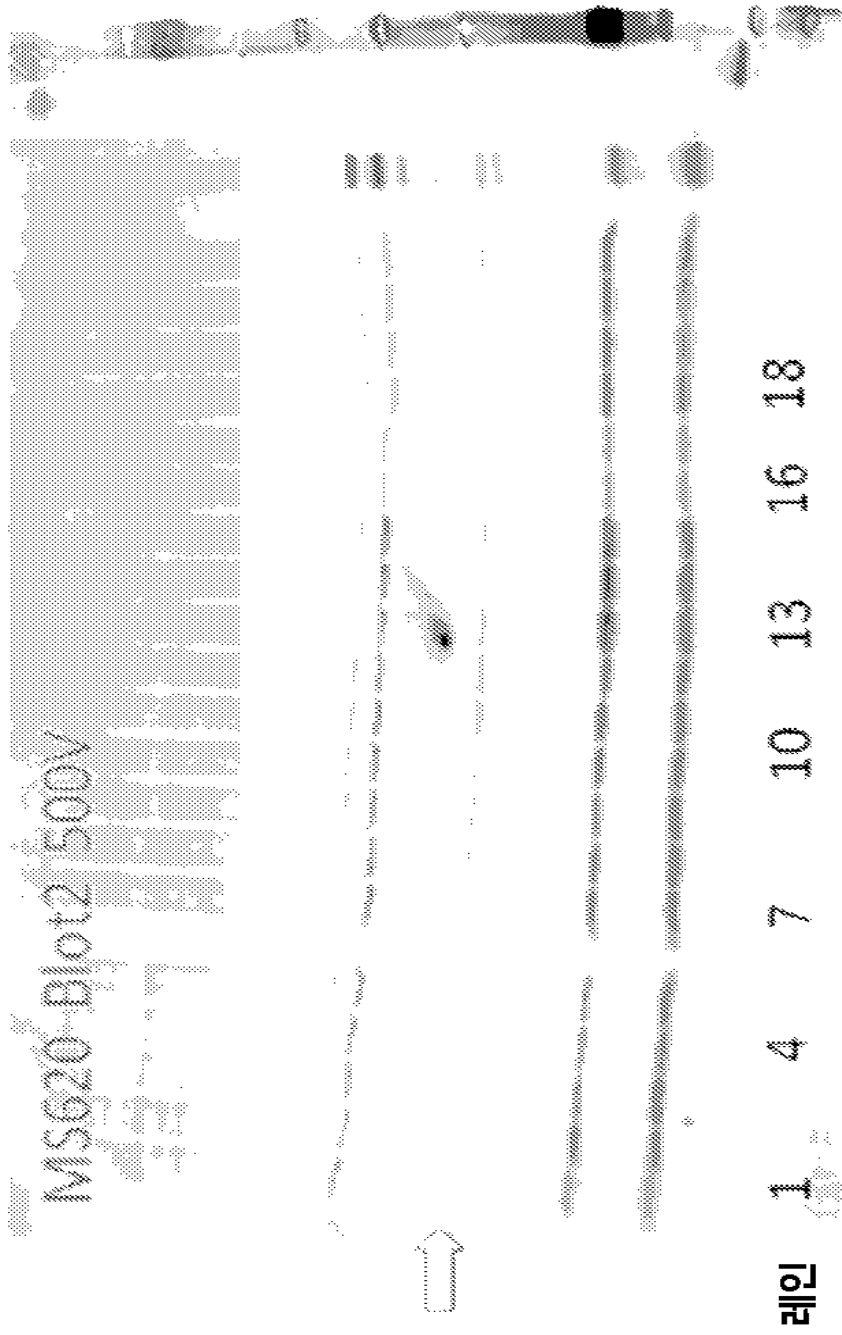
도면20



도면21

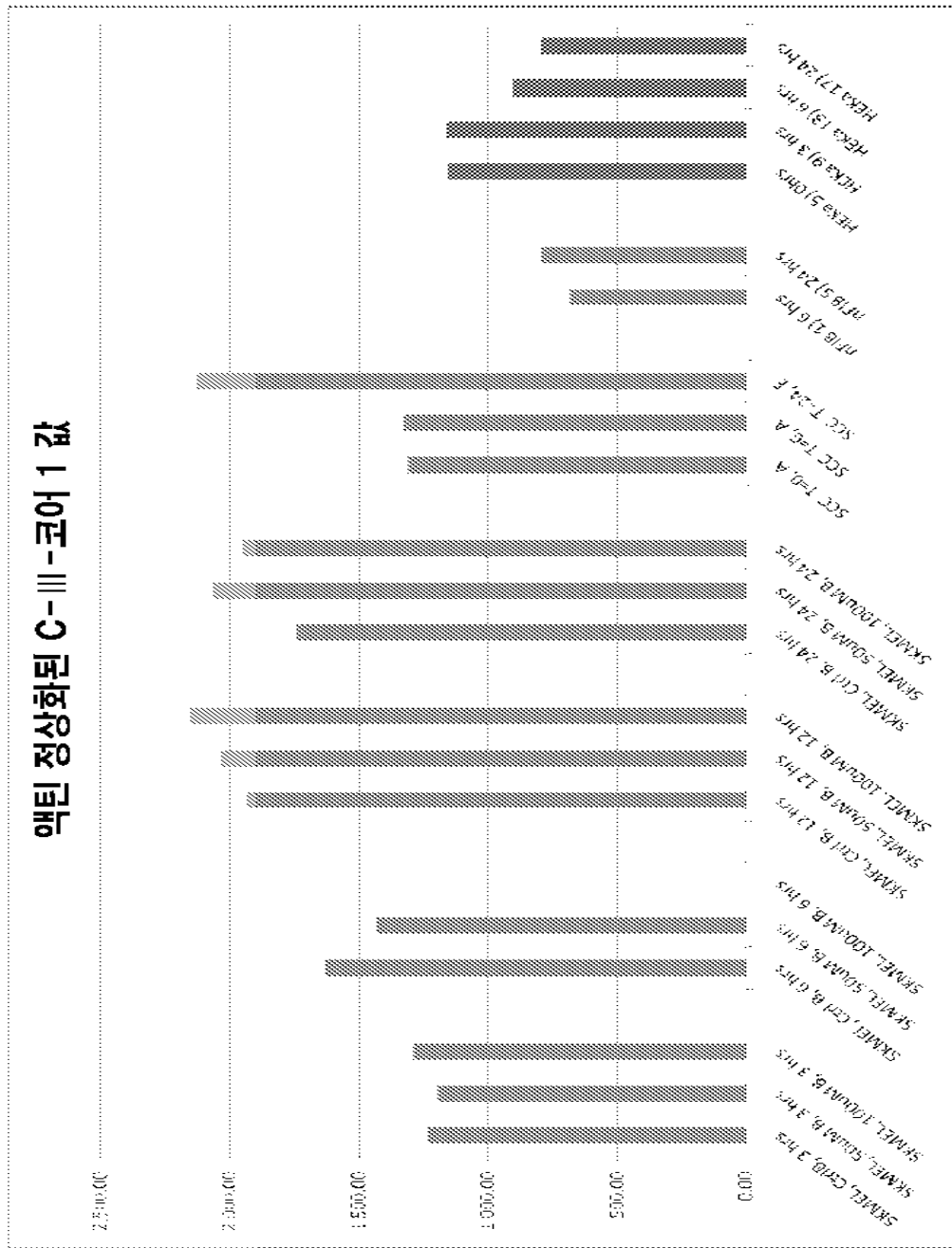


도면22



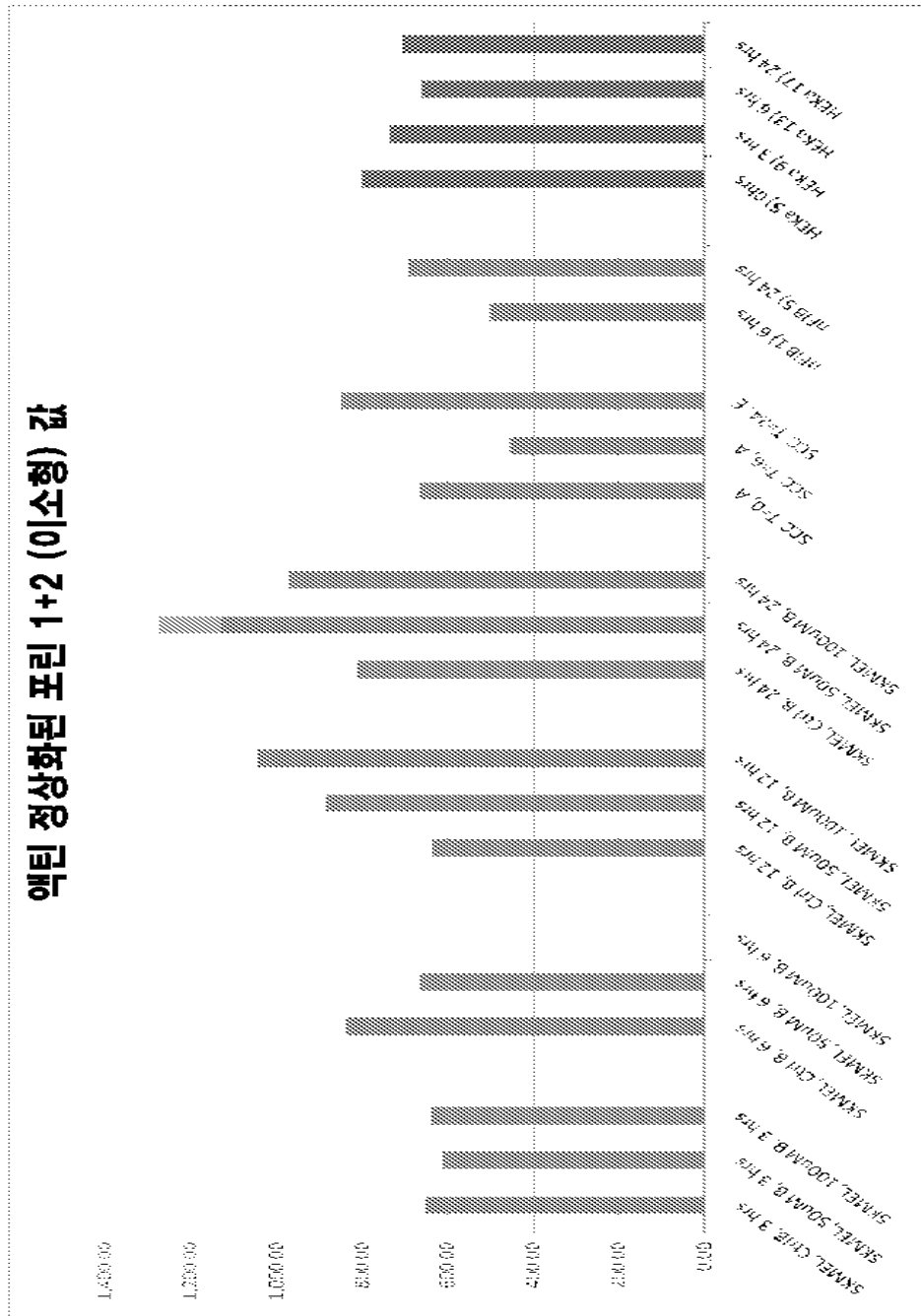


도면24

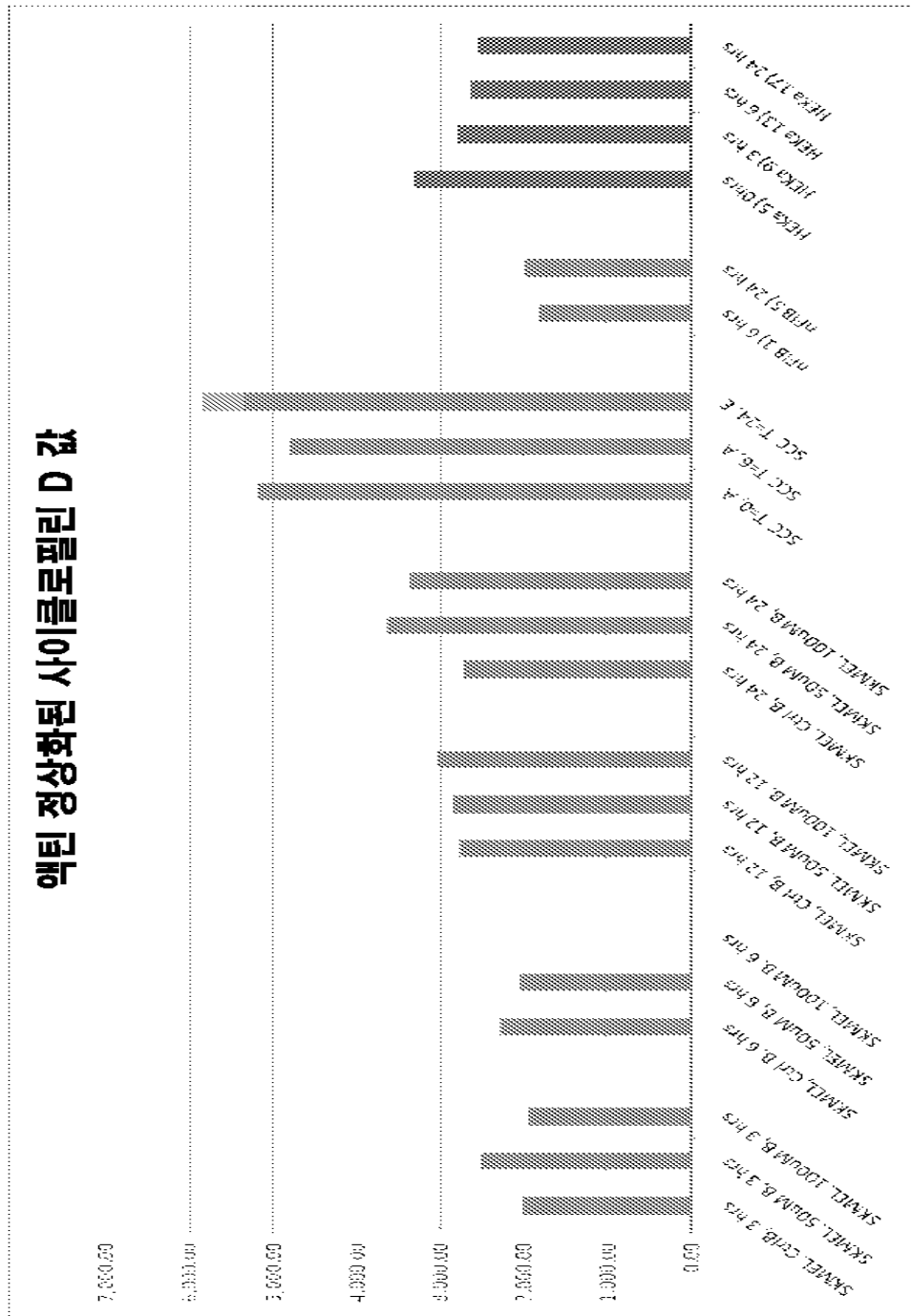




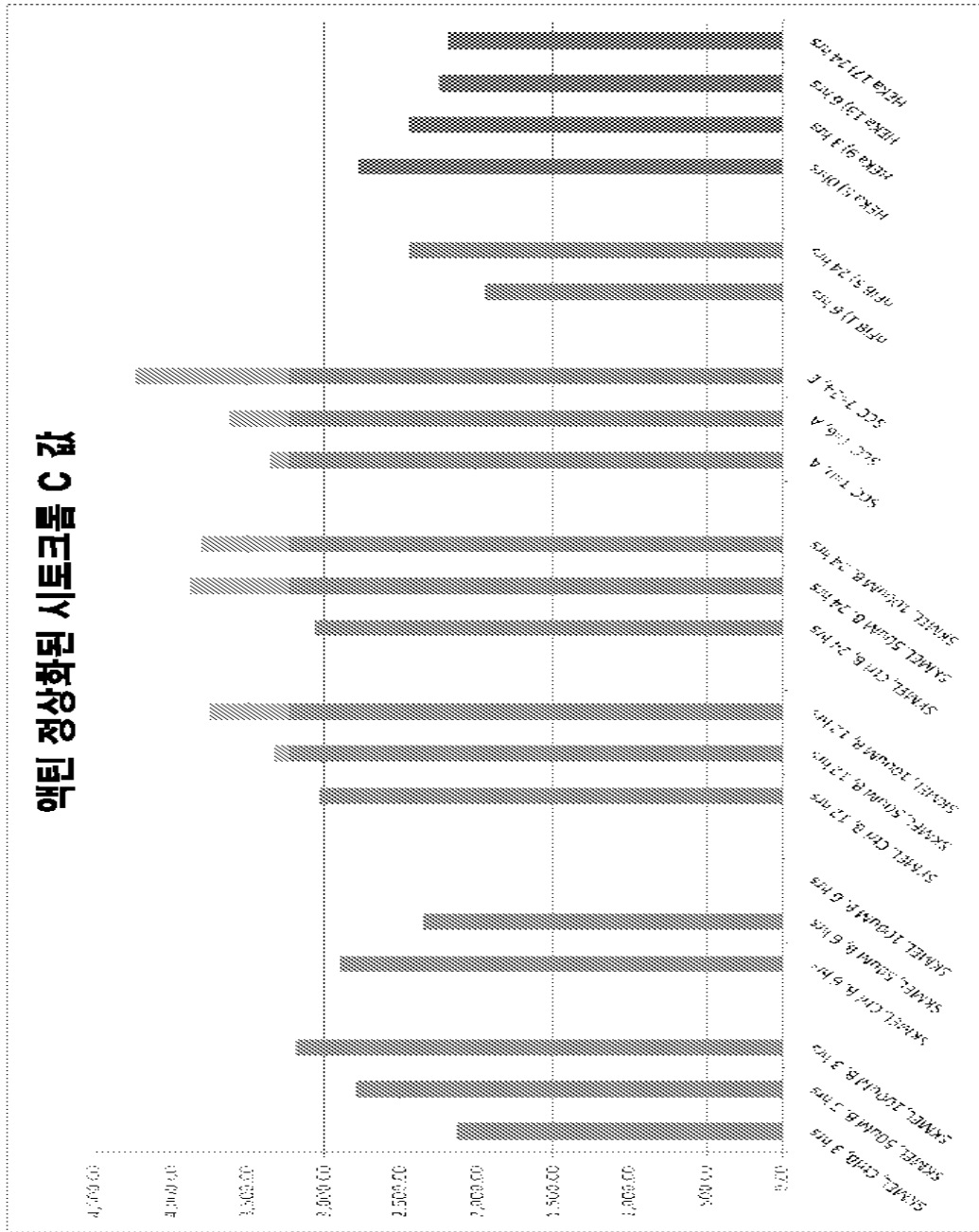
도면25



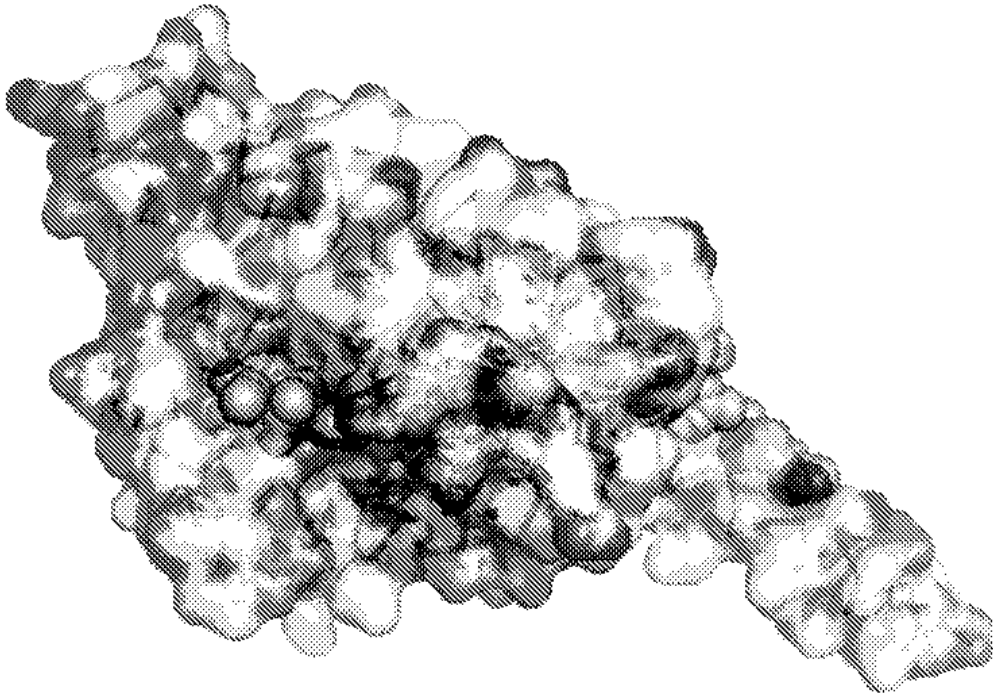
도면26



도면27

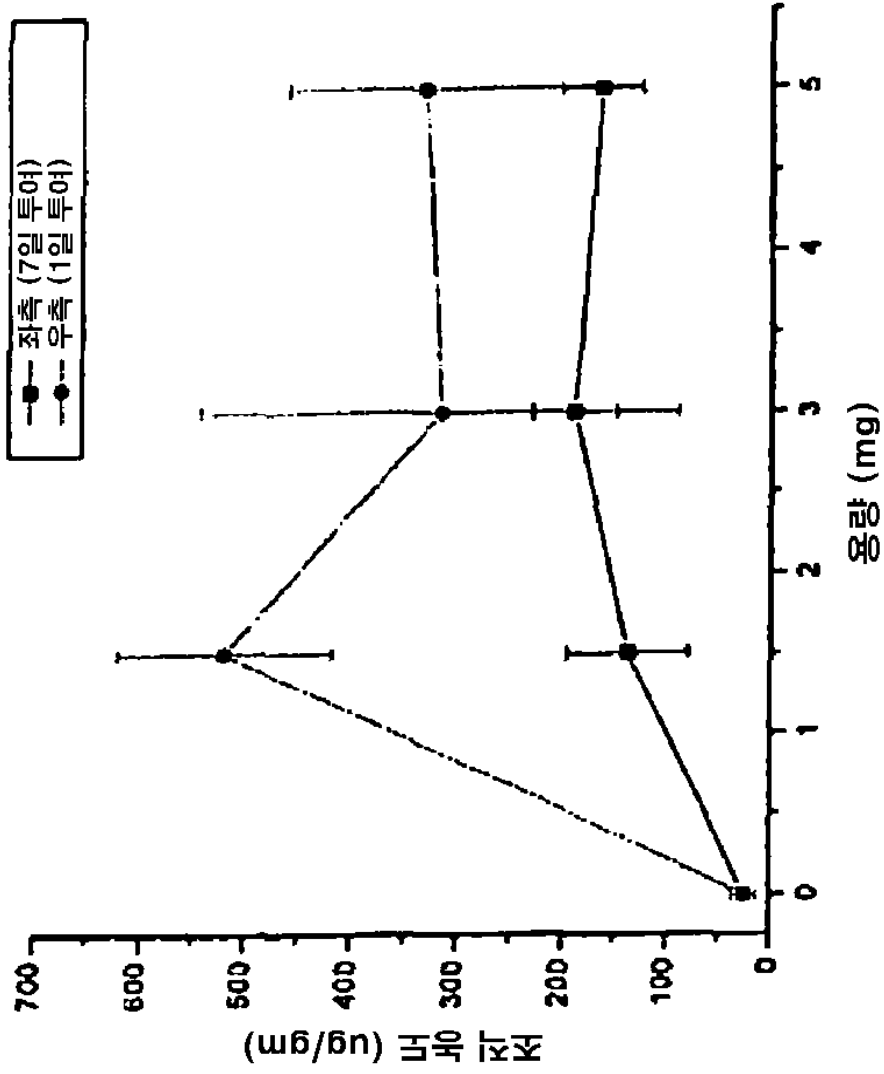


도면28



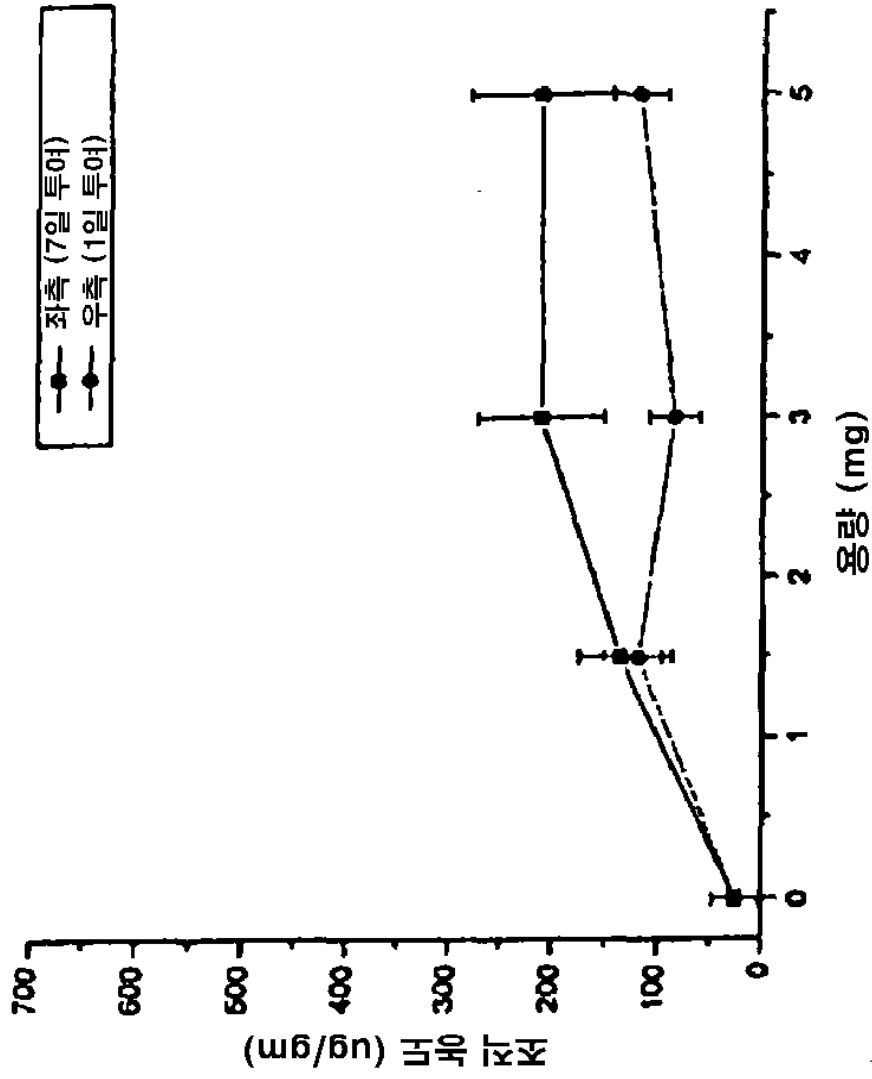
도면29

평균 ± SD CoQ<sub>10</sub> 표피 농도 대 용량 (수컷 돼지): (n=6/피부 절편)

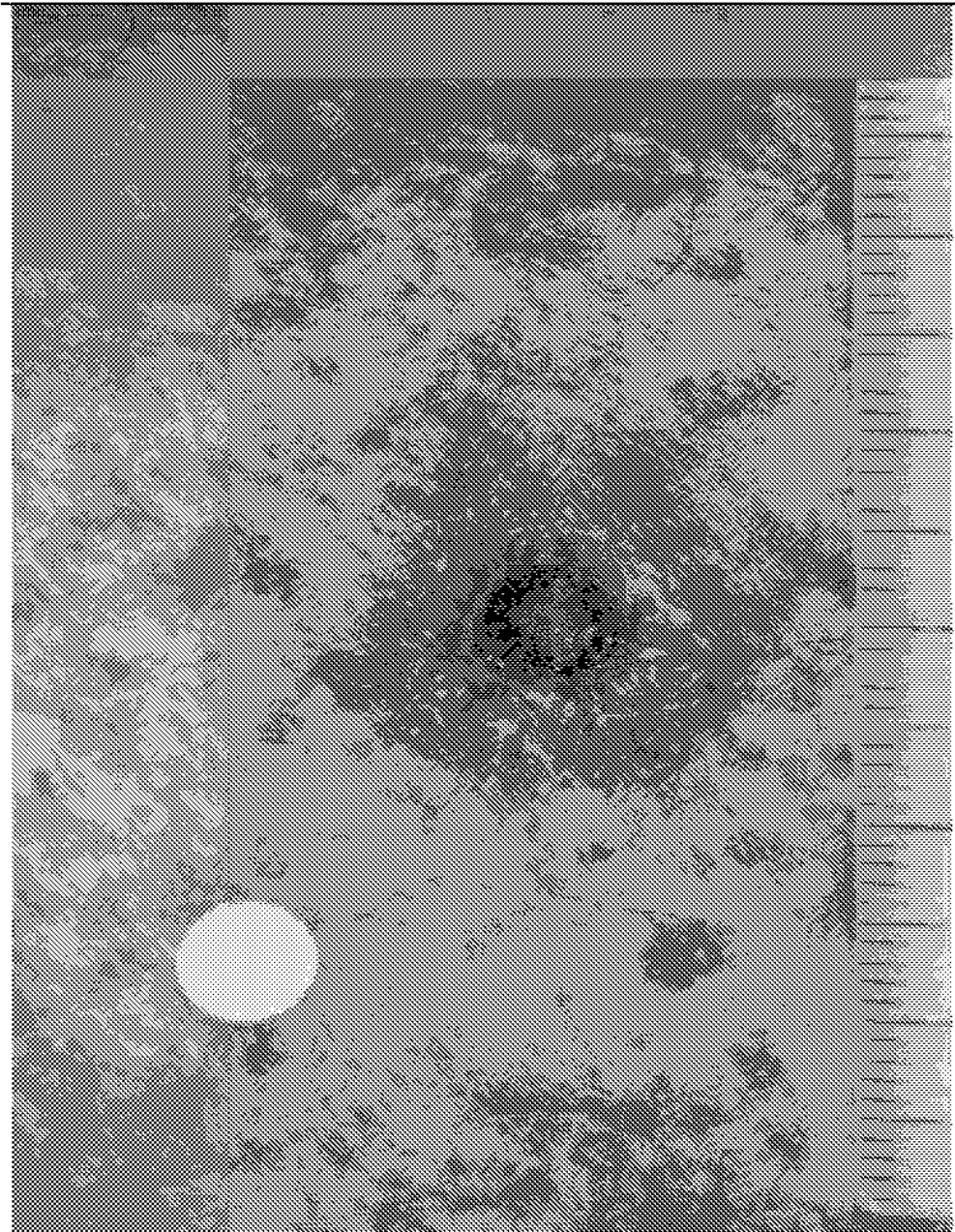


도면30

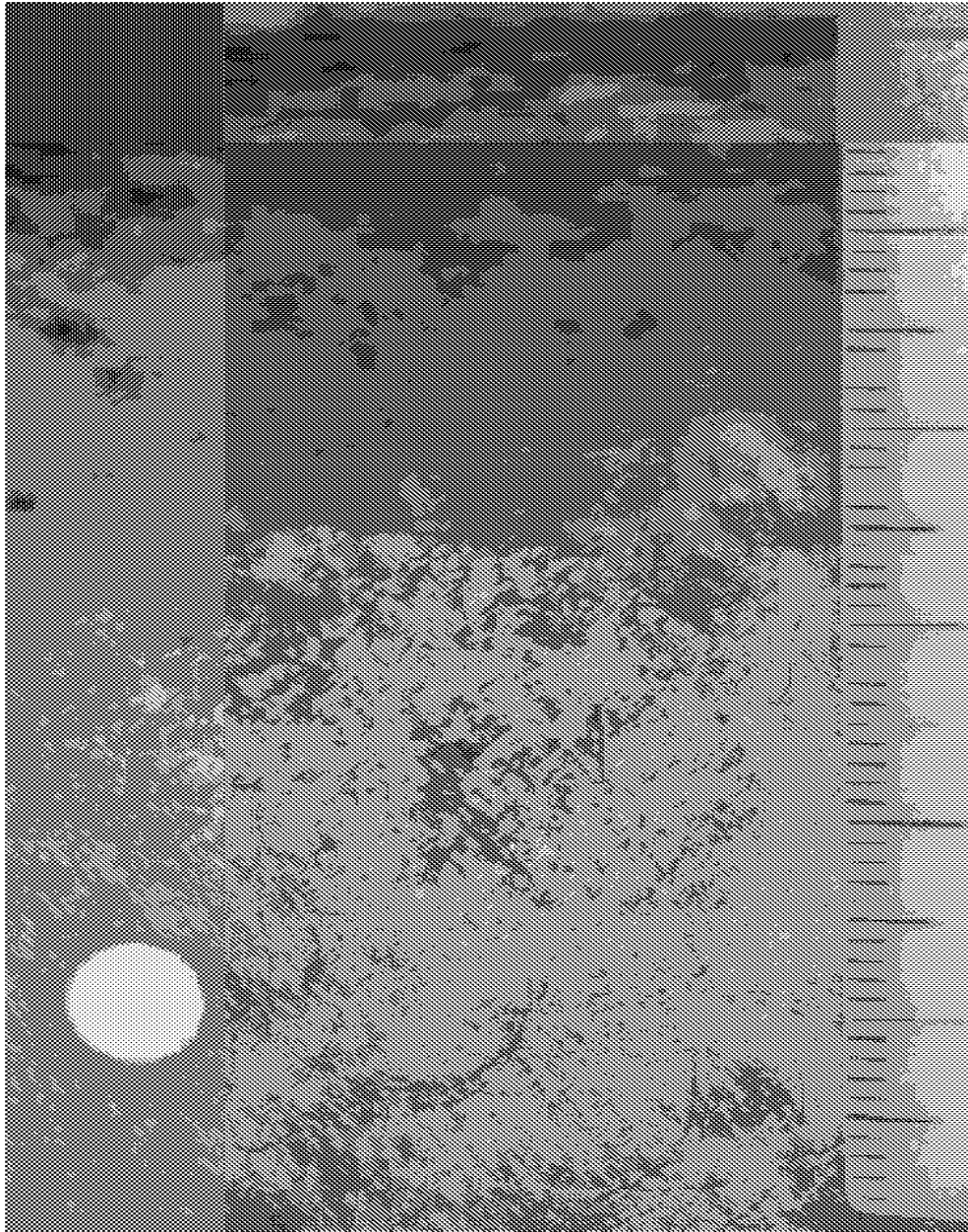
평균 ± SD CoQ<sub>10</sub> 표피 농도 대 용량 (암컷 돼지): (n=6/피부 절편)



도면31

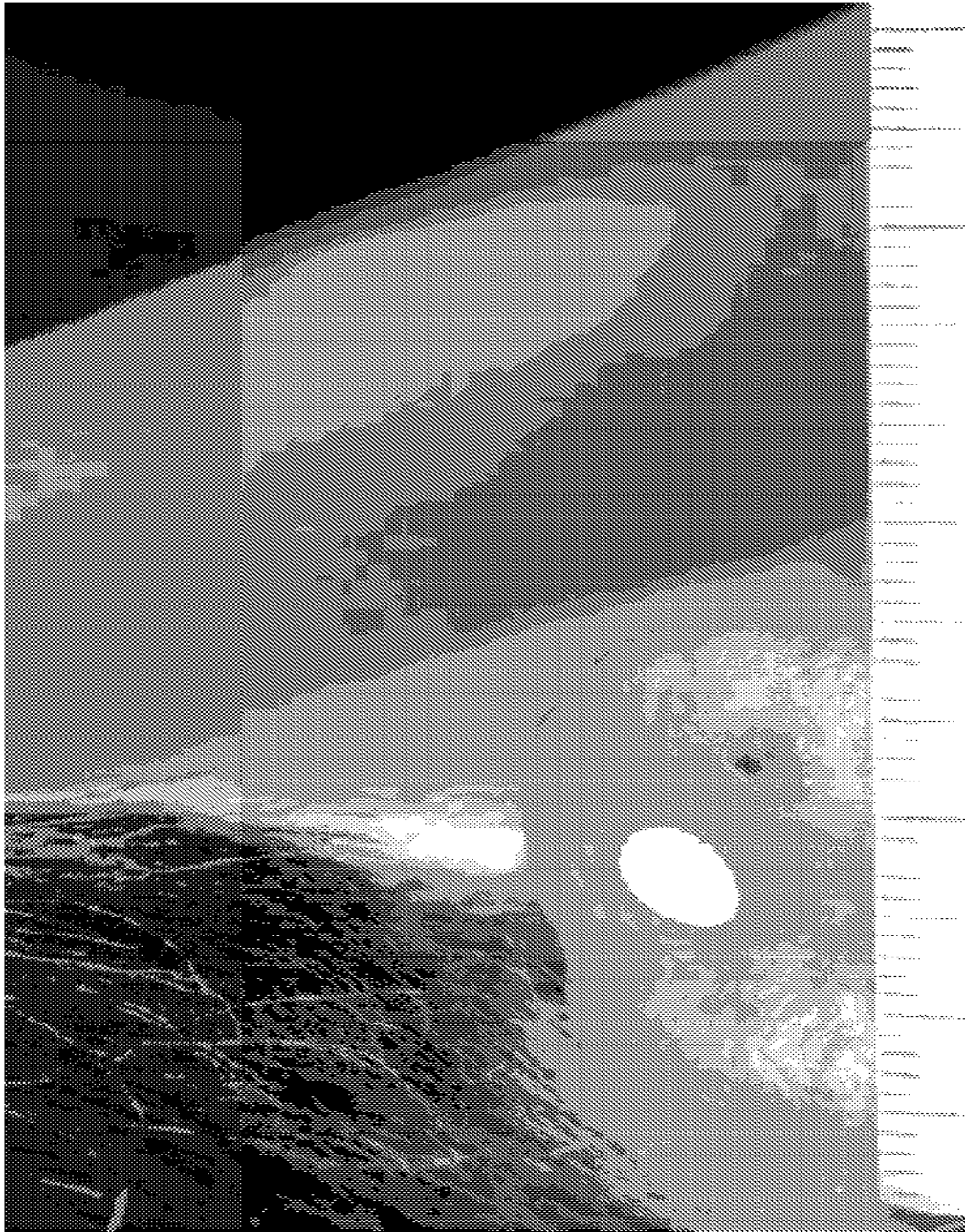


도면32

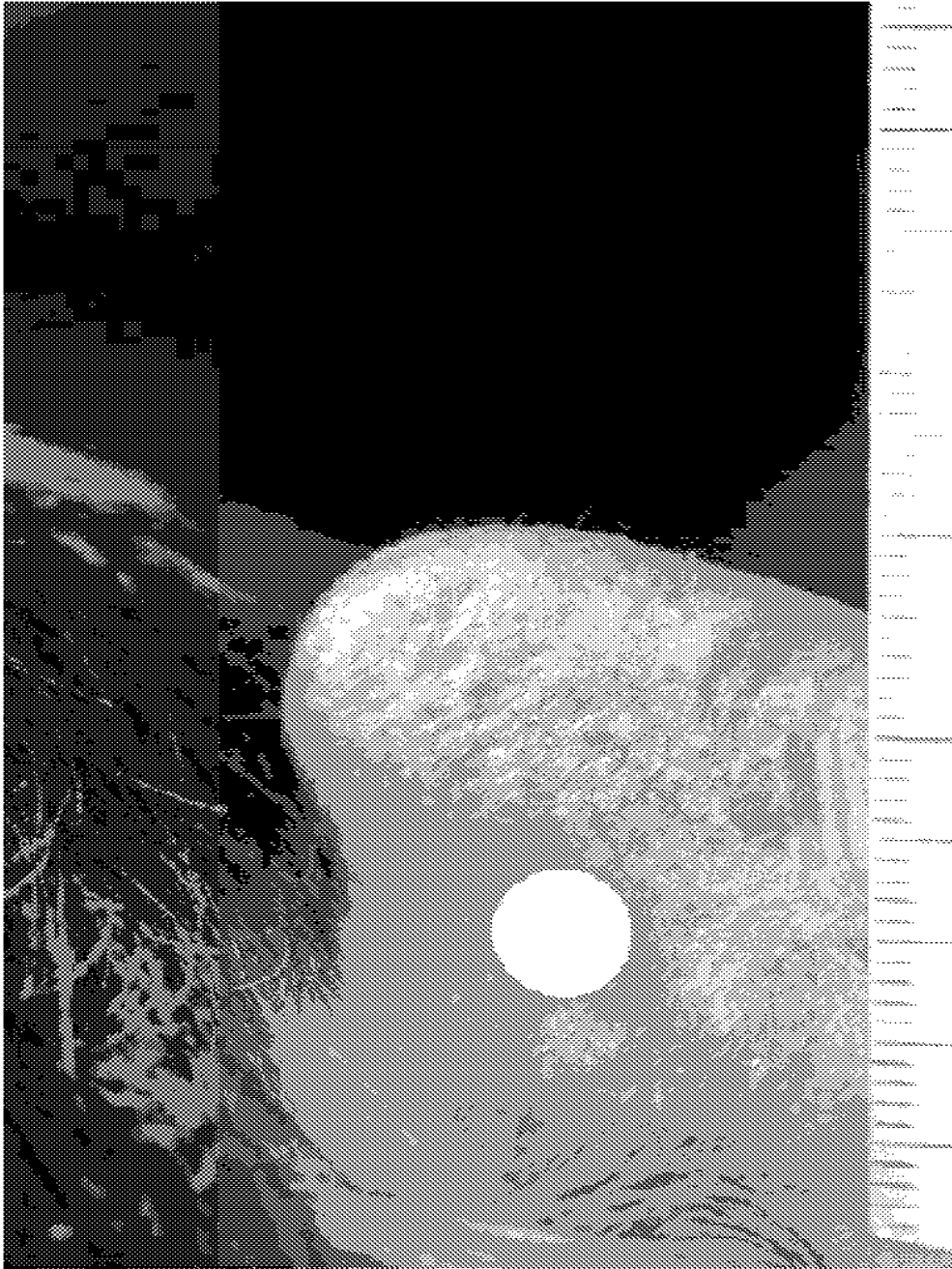




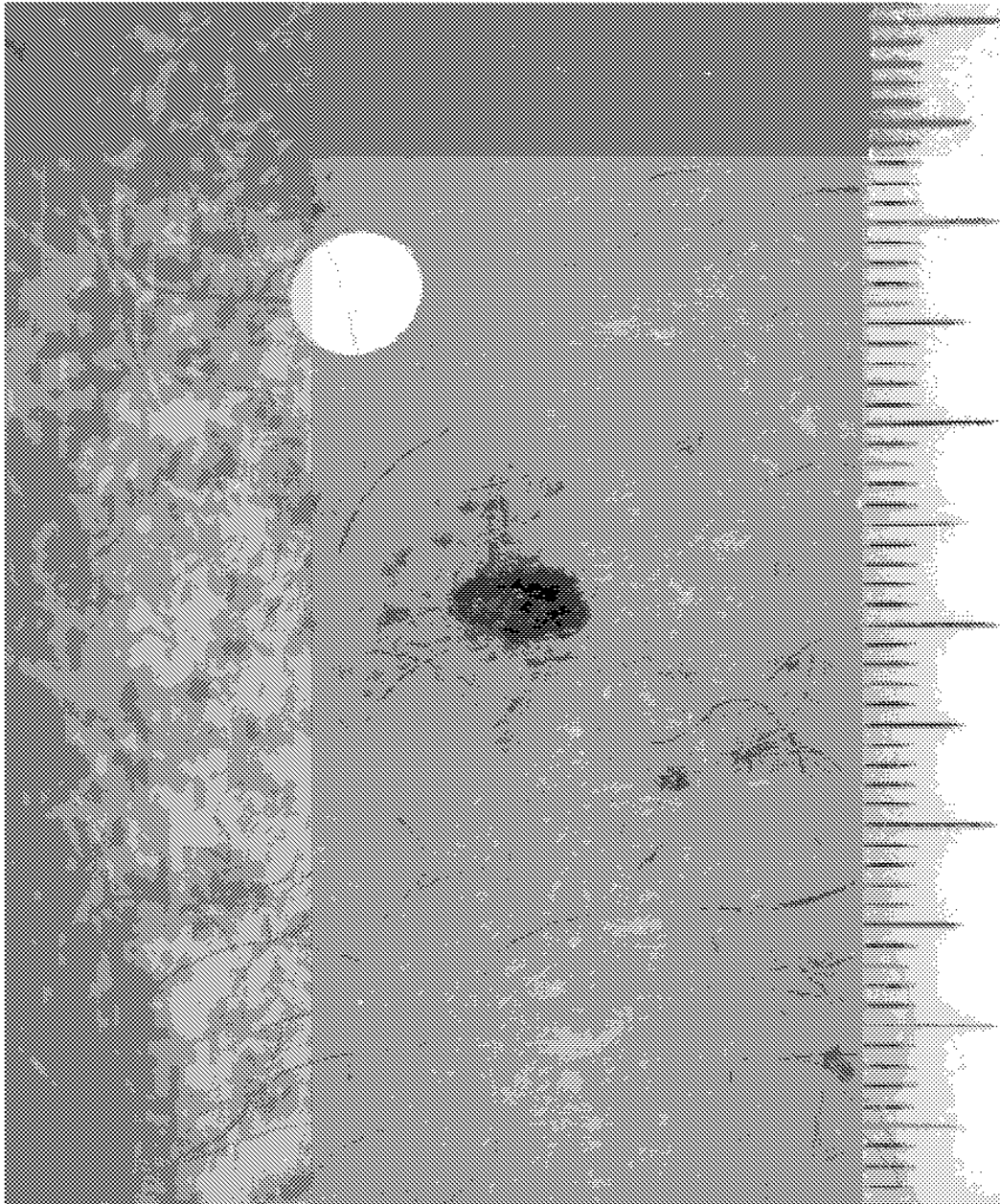
도면33



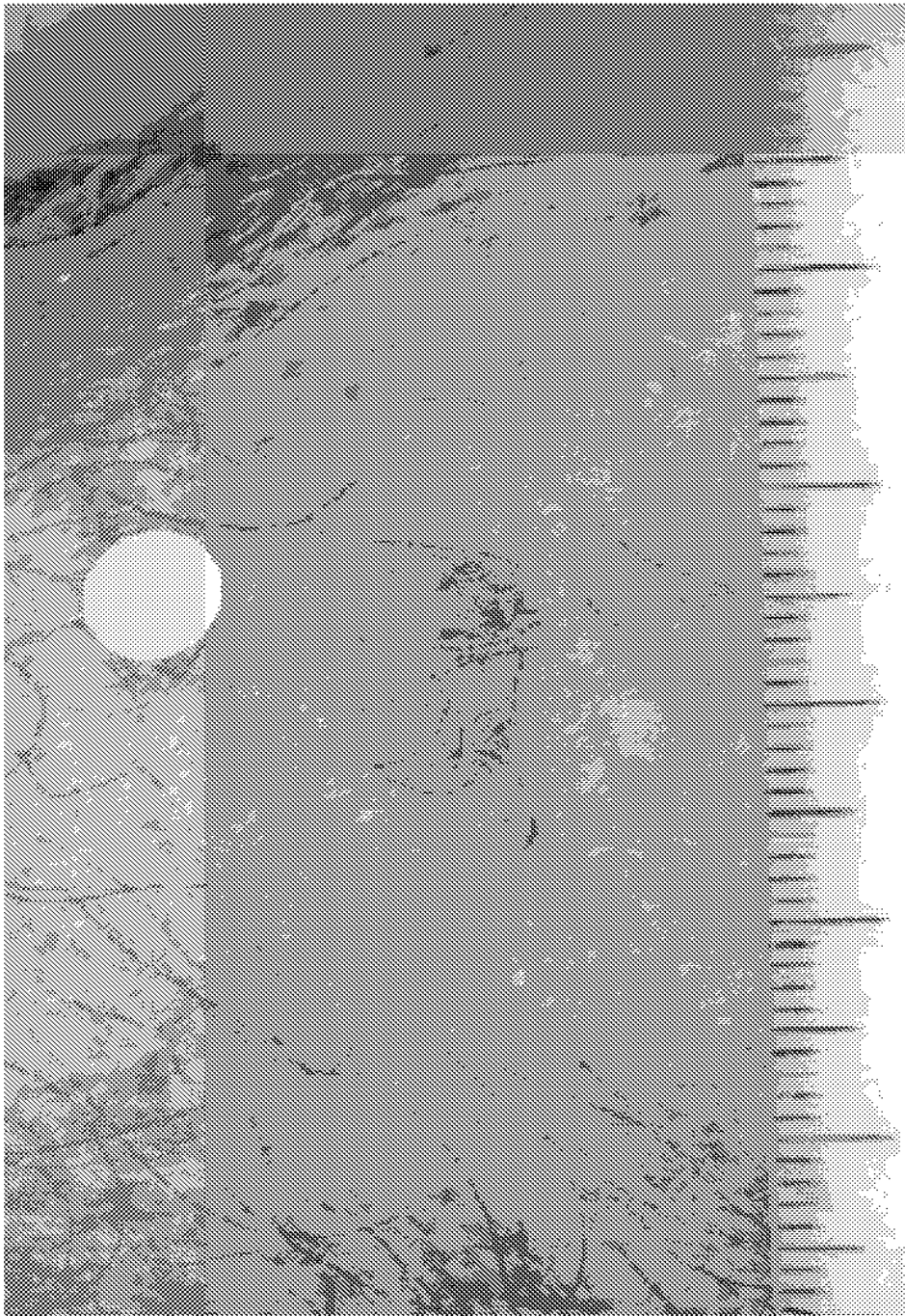
도면34



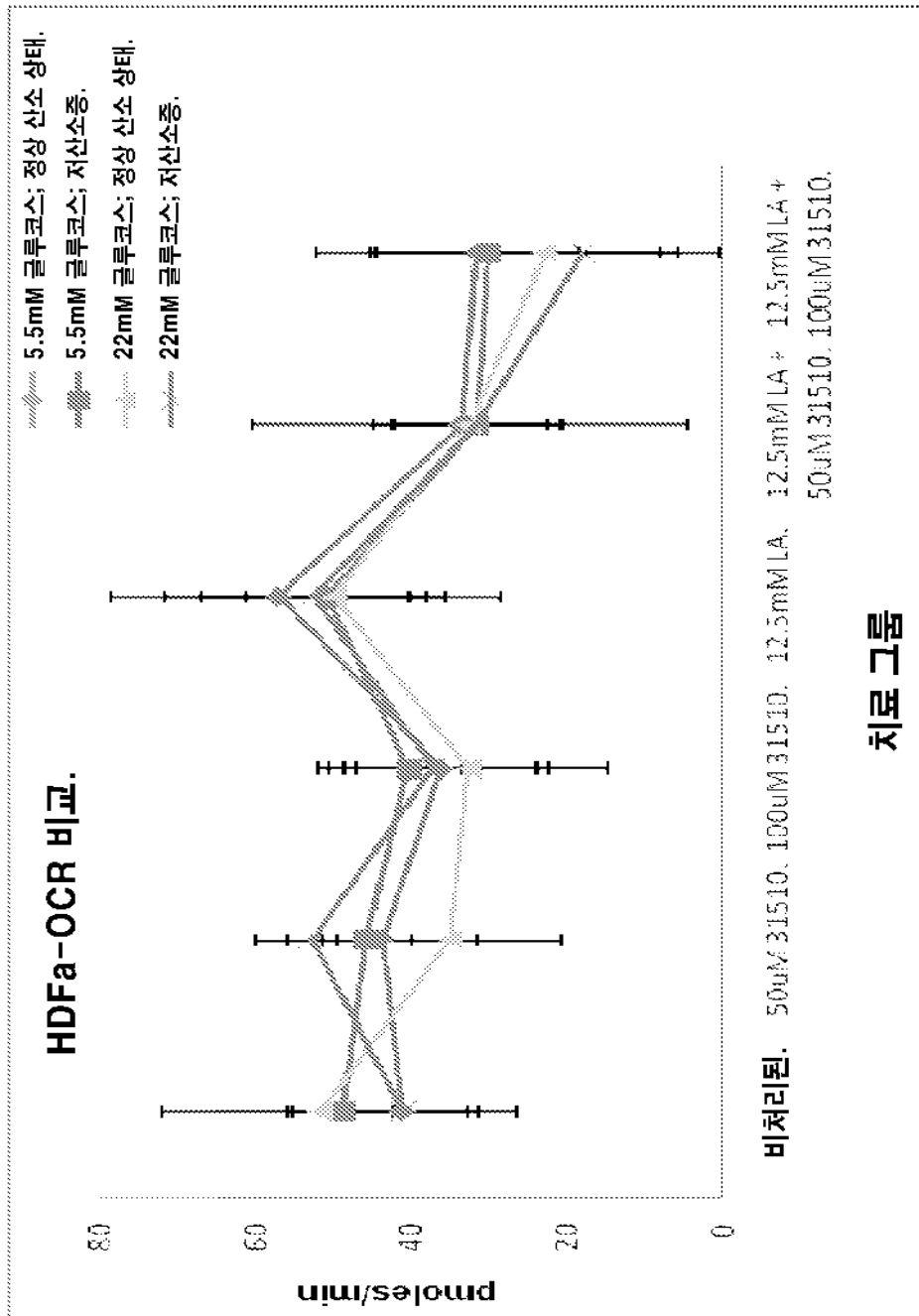
도면35



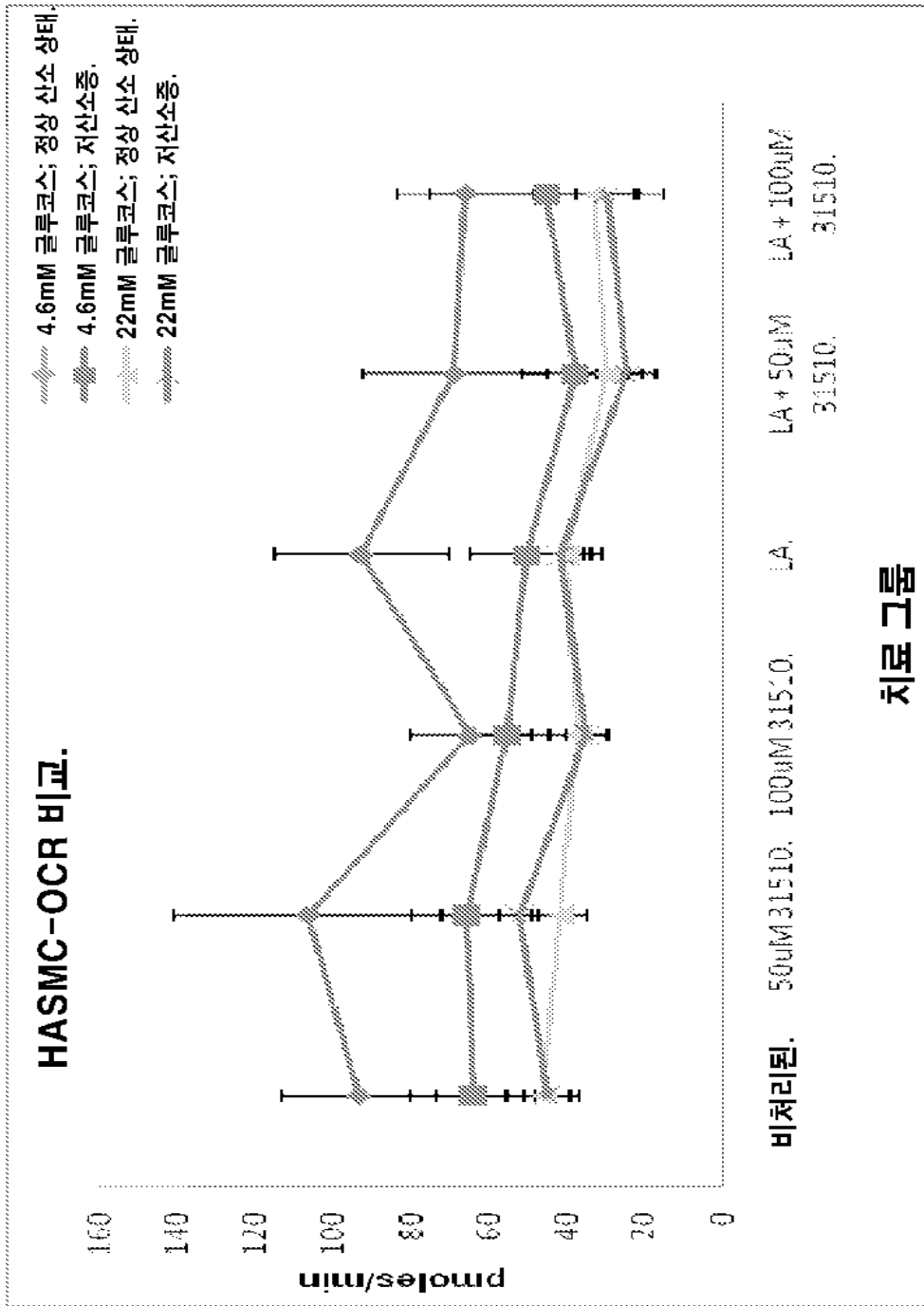
도면36



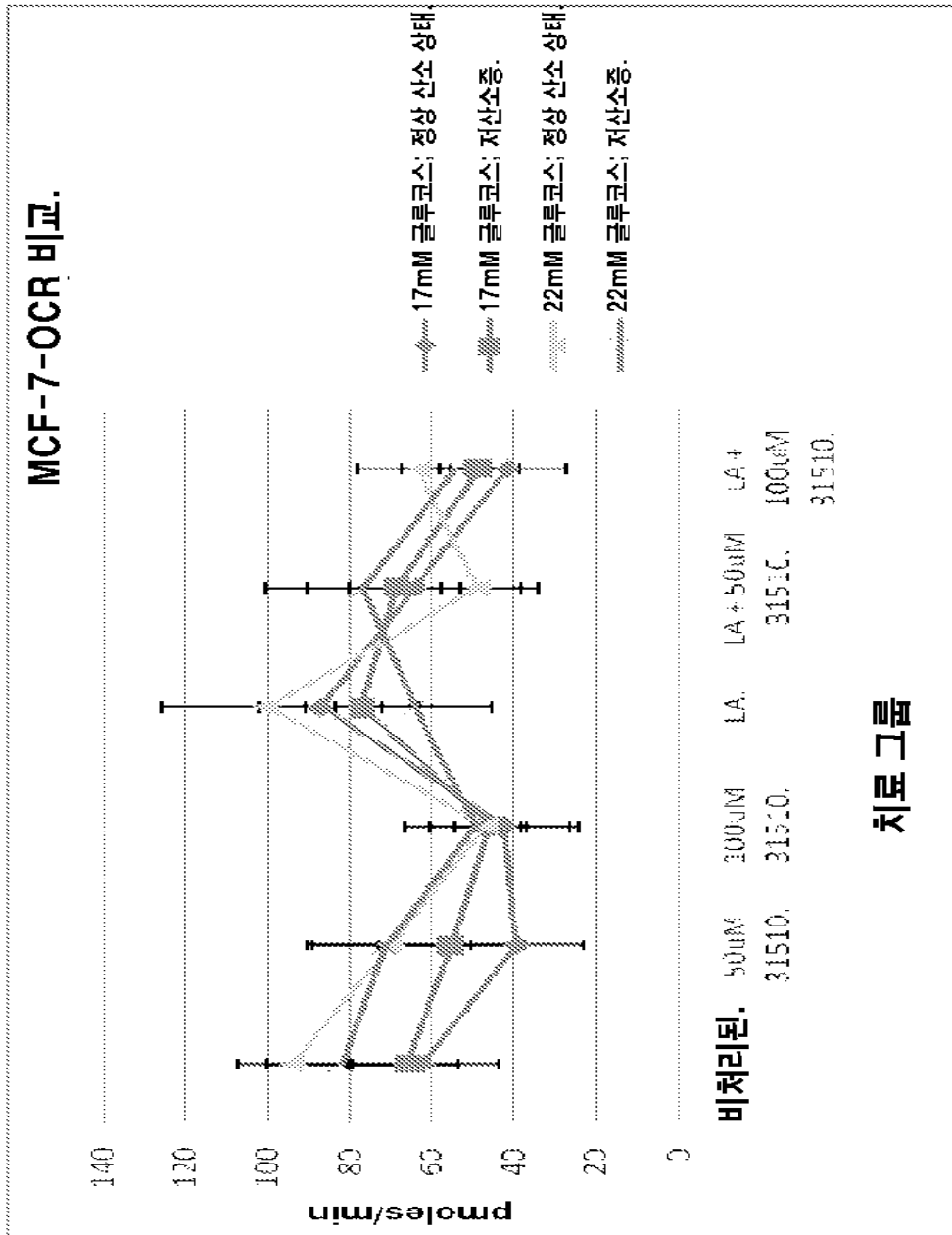
도면37



도면38



도면39



도면40

