

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 587**

51 Int. Cl.:

A61K 31/351 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2005** **E 05711599 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013** **EP 1718283**

54 Título: **Formulaciones tópicas de coenzima Q10 y métodos de uso**

30 Prioridad:

22.01.2004 US 538319 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1475 NW 12TH AVENUE, SUITE 2012
MIAMI, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**HSIA, SUNG, LAN;
NARAIN, NIVEN, RAJIN;
LI, JIE;
RUSSELL, KATHRYN, J.;
WOAN, KARRUNE, V. y
PERSAUD, INDUSHEKHAR**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 410 587 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones tópicas de coenzima Q10 y métodos de uso.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden coenzima Q10 (CoQ10) útil para el tratamiento del cáncer, la reducción selectiva del crecimiento de células cancerosas, la inducción de apoptosis en células cancerosas y la inhibición de angiogénesis mediada por tumor.

10

Antecedentes

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en naciones desarrolladas. Aunque la investigación reciente ha aumentado considerablemente nuestra comprensión de muchos de los mecanismos moleculares de la tumorigénesis y ha proporcionado numerosas posibilidades nuevas para el tratamiento del cáncer, los tratamientos convencionales para la mayoría de los tumores malignos siguen siendo resección total, quimioterapia y radioterapia. Aunque cada vez son más satisfactorios, cada uno de estos tratamientos todavía produce numerosos efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, la cirugía da como resultado dolor, lesión traumática a tejido sano y cicatrización. La radioterapia y la quimioterapia producen náuseas, supresión inmunitaria, ulceración gástrica y tumorigénesis secundaria.

Sumario

La invención se refiere al descubrimiento de que formulaciones tópicas de CoQ10 pueden reducir la tasa de crecimiento tumoral en un sujeto animal. En los experimentos descritos en el presente documento, se demostró que la CoQ10 aumenta la tasa de apoptosis en un cultivo de células cancerosas cutáneas pero no de células normales. Además, se demostró que el tratamiento de animales portadores de tumor con una formulación tópica de CoQ10 reduce espectacularmente la tasa de crecimiento tumoral en los animales.

La CoQ10 formulada para administración oral se ha usado previamente como complemento dietético. Sin embargo, se ha demostrado que la CoQ10 administrada por vía oral se acumula en el hígado, disminuyendo su disponibilidad sistémica. Las respuestas antitumorales observadas con la CoQ10 aplicada por vía tópica pueden estar relacionadas con su biodisponibilidad superior en comparación con las formas de complemento dietético de la CoQ10. El documento US-B2-6 582 723 da a conocer una composición ingerida por vía oral que comprende ácidos grasos omega 3, fibra dietética de polisacáridos procedente de salvado de arroz con el extracto enzimático de setas shiitake y coenzima Q10 para prevenir o tratar el cáncer.

Por consiguiente, la invención presenta el uso de una composición liposómica tópica que comprende coenzima Q10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención presenta una composición liposómica tópica que comprende una cantidad eficaz de CoQ10, Phospholipon 90, glicerol, BHT, etanol, triglicéridos de cadena media (MCT) y lavanda.

Las realizaciones preferidas de la composición tópica según la invención se explican resumidamente en las reivindicaciones 2 a 6.

Las realizaciones preferidas del uso según la invención se explican resumidamente en las reivindicaciones 8 a 19.

La inhibición del crecimiento de células tumorales se refiere a uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, incluyendo, (i) ralentización y (ii) detención completa del crecimiento; (2) reducción en el número de células tumorales; (3) mantenimiento del tamaño tumoral; (4) reducción en el tamaño tumoral; (5) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (6) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de metástasis; (7) potenciación de respuesta inmunitaria antitumoral, que puede dar como resultado (i) mantenimiento del tamaño tumoral, (ii) reducción del tamaño tumoral, (iii) ralentización del crecimiento de un tumor, (iv) reducción, ralentización o prevención de invasión y/o (8) alivio, en cierta medida, de la gravedad o el número de uno o más síntomas asociados con el trastorno.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Las definiciones entendidas comúnmente de términos médicos pueden encontrarse en Thomas Lathrop Stedman, Stedman's Medical Dictionary, Lippincott, Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000.

En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, controlará las definiciones incluidas. Las realizaciones particulares comentadas a continuación son únicamente ilustrativas.

Otros aspectos de la invención se describen más adelante.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La invención se muestra con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas anteriores y adicionales de esta invención pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:
- 10 La figura 1 es una serie de microfotografías que muestran el efecto de la CoQ10 en células de melanoma humano (SKMEL28) en un cultivo *in vitro*.
- La figura 2 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de melanoma humano (SKMEL28) en un cultivo *in vitro* de 36 horas.
- 15 La figura 3 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de melanoma humano (SKMEL28) en un cultivo *in vitro* de 48 horas.
- La figura 4 es un gráfico que muestra que el control con vehículo no reduce la proliferación de una línea celular de melanoma humano (SKMEL28) en un cultivo *in vitro* de 48 horas.
- 20 La figura 5 es un gráfico que compara el efecto de la CoQ10 en la apoptosis entre melanoma humano y fibroblastos neonatales en un cultivo *in vitro*.
- La figura 6 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de células de carcinoma escamoso en un cultivo *in vitro* de 48 horas.
- 25 La figura 7 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de fibroblastos neonatales humanos en un cultivo *in vitro* de 48 horas.
- 30 La figura 8 es un gráfico que muestra que la CoQ10 aumenta la proliferación de queratinocitos neonatales humanos en un cultivo *in vitro* de 48 horas.
- La figura 9 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7) en un cultivo *in vitro* de 48 horas. La línea celular MCF-7 expresa el oncogén WNT7B y contiene el oncogén Tx-4.
- 35 La figura 10 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7) en un cultivo *in vitro* de 72 horas.
- 40 La figura 11 es una fotografía que muestra tumores inducidos en ratones tratados con CoQ10 y control tras el tratamiento con formulación tópica de CoQ10 durante 30 días.
- La figura 12 es una fotografía que muestra tumores inducidos en ratones tratados con CoQ10 y control tras el tratamiento con formulación tópica de CoQ10 durante 30 días.
- 45 La figura 13 es una fotografía que muestra tumores extirpados de ratones tratados con CoQ10 y control.
- La figura 14 es un gráfico que muestra el efecto de la administración de CoQ10 en el tamaño tumoral en ratones tratados con CoQ10 o control durante 30 días. La masa tumoral promedio para el grupo control frente al grupo de tratamiento disminuyó en un 52,3% y un 54,0%, respectivamente.
- 50 La figura 15 es una serie de microfotografías que muestran el efecto de la CoQ10 en células de adenocarcinoma de mama humano (SK-BR-3) en un cultivo *in vitro*. La línea celular SK-BR-3 sobreexpresa el producto génico de los genes Her2/c-erb-2 (ATCC).
- 55 La figura 16 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (SK-BR-3) en un cultivo *in vitro* de 48 horas. La línea celular SK-BR-3 sobreexpresa el producto génico de los genes Her2/c-erb-2 (ATCC).
- 60 La figura 17 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (SK-BR-3) en un cultivo *in vitro* de 72 horas. La línea celular SK-BR-3 sobreexpresa el producto génico de los genes Her2/c-erb-2 (ATCC).
- 65 La figura 18 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468) en un cultivo *in vitro* de 48 horas. La línea celular MDA-MB-468 tiene una mutación en el gen p53 (ATCC).

La figura 19 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-468) en un cultivo *in vitro* de 72 horas. La línea celular MDA-MB-468 tiene una mutación en el gen p53 (ATCC).

5 La figura 20 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (BT-20) en un cultivo *in vitro* de 48 horas. La línea celular BT-20 expresa los oncogenes WNT7B y WNT3 (ATCC).

10 La figura 21 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (BT-20) en un cultivo *in vitro* de 72 horas. La línea celular BT-20 expresa los oncogenes WNT7B y WNT3 (ATCC).

15 La figura 22 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep 3B) en un cultivo *in vitro* de 48 horas.

La figura 23 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep 3B) en un cultivo *in vitro* de 72 horas.

20 La figura 24 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de osteosarcoma humano (143B) en un cultivo *in vitro* de 48 horas.

La figura 25 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de osteosarcoma humano (143B) en un cultivo *in vitro* de 72 horas.

25 La figura 26 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma prostático humano (PC-3) en un cultivo *in vitro* de 48 horas.

La figura 27 es un gráfico que muestra que la CoQ10 reduce la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma prostático humano (PC-3) en un cultivo *in vitro* de 72 horas.

30 La figura 28 es un gráfico que muestra el efecto de CoQ10 en la polarización mitocondrial (un indicador de la apoptosis) de una línea celular de adenocarcinoma prostático humano (PC-3) en un cultivo *in vitro* de 24 horas. Se trataron cultivos de células PC-3 con Q10 a concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,2 mM durante 24 h y luego se trataron con JC-1, a 10 microgramos/ml, durante 30 min. Se midieron la captación y los niveles de fluorescencia verde en un citómetro de flujo, FL1 (fluorescencia verde). Nota: Se observó un aumento significativo en la fluorescencia verde en las células tratadas con Q10 0,2 mM (gráfico amarillo).

35 Las figuras 29A y 29B son fotografías que muestran inhibición de angiogénesis mediada por tumor en tejidos mediante una composición que comprende CoQ10 (figura 29B) en comparación con un control en ausencia de una composición que comprende CoQ10.

Descripción detallada

45 La invención proporciona composiciones según la reivindicación 1 para reducir la tasa de crecimiento de células tumorales o aumentar la tasa de apoptosis de células tumorales. Una composición preferida de la invención es una formulación tópica según la reivindicación 1 que comprende al menos un 1% de CoQ10. La composición más preferida comprende entre el 1% y el 15% de CoQ10.

50 Las realizaciones preferidas descritas a continuación ilustran adaptaciones de estas composiciones. No obstante, a partir de la descripción de estas realizaciones, pueden obtenerse y/o ponerse en práctica otros aspectos de la invención basándose en la descripción proporcionada a continuación.

Definiciones

55 Según la presente invención y tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

Tal como se usan en el presente documento, “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte otra cosa.

60 Tal como se usa en el presente documento, un componente “farmacéuticamente aceptable” es uno que es adecuado para su uso con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una razón beneficio/riesgo razonable.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad segura y terapéutica eficaz” se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios

adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una razón beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de esta invención. Mediante “cantidad terapéuticamente eficaz” se quiere decir una cantidad de un compuesto de la presente invención eficaz para proporcionar la respuesta terapéutica deseada. Por ejemplo, una cantidad eficaz para retrasar el crecimiento de o la producción de un cáncer, ya sea un

Tal como se usa en el presente documento, una “sal farmacéutica” incluye, pero no se limita a, sales de ácidos orgánicos o minerales de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Preferiblemente, las sales se preparan usando un ácido orgánico o inorgánico. Estas sales de ácido preferidas son cloruros, bromuros, sulfatos, nitratos, fosfatos, sulfonatos, formiatos, tartratos, maleatos, malatos, citratos, benzoatos, salicilatos, ascorbatos y similares. La sal más preferida es la sal de clorhidrato.

Tal como se usa en el presente documento, “cáncer” se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasma o tumores malignos encontrados en mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. En realizaciones preferidas, se usan composiciones de CoQ10 para el tratamiento de diversos tipos de cáncer de mama; cáncer de próstata; cáncer de hígado; cáncer de huesos. Sin embargo, el tratamiento que usa las composiciones de CoQ10 no se limita a estos tipos de cánceres.

Ejemplos de cánceres son cáncer de cerebro, mama, páncreas, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, pulmón de células no pequeñas, melanoma, mesotelioma, ovario, sarcoma, estómago, útero y meduloblastoma. Tal como se usan en el presente documento, los términos “cáncer,” “neoplasma” y “tumor,” se usan de manera intercambiable y ya sea en forma singular o plural, se refieren a células que han experimentado una transformación maligna que hace que sean patológicas para el organismo huésped. Las células cancerosas primarias (es decir, células obtenidas de cerca del sitio de la transformación maligna) pueden distinguirse fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, particularmente examen histológico. La definición de una célula cancerosa, tal como se usa en el presente documento, incluye no sólo una célula cancerosa primaria, sino cualquier célula derivada de un antecesor de célula cancerosa. Esto incluye células cancerosas metastatizadas, y líneas celulares y cultivos *in vitro* derivados de células cancerosas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor “clínicamente detectable” es uno que es detectable basándose en la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos tales como TAC, obtención de imágenes mediante RM, rayos X, ultrasonido o palpación, y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra que puede obtenerse de un paciente.

El término “sarcoma” se refiere en general a un tumor que está constituido por una sustancia como el tejido conjuntivo embrionario y está compuesto generalmente de células estrechamente empaquetadas integradas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los ejemplos de sarcomas que pueden tratarse con las presentes composiciones y opcionalmente un potenciador y/o agente quimioterápico incluyen, pero no se limitan a condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, sarcoma cloromatoso, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado idiopático múltiple, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parostal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma serocístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectático.

El término “melanoma” se refiere a un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas que pueden tratarse con las composiciones de la invención y opcionalmente con un potenciador y/u otro agente quimioterápico incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma lentiginoso maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma, subungueal y melanoma de extensión superficial.

El término “carcinoma” se refiere a un nuevo crecimiento maligno constituido por células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los carcinomas que pueden tratarse con las composiciones de la invención y opcionalmente un potenciador y/u otro agente quimioterápico incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenocístico, carcinoma quístico adenoide, carcinoma adenomatoso, carcinoma de la corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoesquamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, comedocarcinoma, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma

cribriforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma canalicular, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epidermoide, carcinoma quístico adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma ulcerado, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosas, carcinoma de la matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma *in situ*, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, *carcinoma lenticulare*, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, *carcinoma medullare*, carcinoma medular, carcinoma melanótico, *carcinoma molle*, carcinoma mucinoso, carcinoma mucíparo, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, *carcinoma mucosum*, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatoide, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células en grano de avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales, carcinoma de riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma schneideriano, carcinoma escirroso, carcinoma escrotal, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoidales, carcinoma de células espinosas, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma en collar, carcinoma telangiectásico, *carcinoma telangiectodes*, carcinoma de células transicionales, *carcinoma tuberosum*, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso y carcinoma veloso.

Los cánceres adicionales que pueden tratarse con las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdiosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores de cerebro primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer del aparato genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer corticosuprarrenal y cáncer de próstata.

“Diagnóstico” o “diagnosticado” significa identificar la presencia o la naturaleza de un estado patológico. Los métodos diagnósticos difieren en su sensibilidad y especificidad. La “sensibilidad” de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de “verdaderos positivos”). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son “falsos negativos”. Los sujetos que no están enfermos y que dan negativo en el ensayo se denominan “verdaderos negativos”. La “especificidad” de un ensayo diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, definiéndose la tasa de “falsos positivos” como la proporción de aquellos sin enfermedad que dan positivo. Aunque un método diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de un estado, basta si el método proporciona una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

Los términos “paciente” o “individuo” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un sujeto mamífero que va a tratarse, prefiriéndose los pacientes humanos. En algunos casos, los métodos de la invención encuentran uso en animales de experimentación, en aplicación veterinaria y en el desarrollo de modelos animales para una enfermedad, incluyendo, pero sin limitarse a, roedores incluyendo ratones, ratas y hámsteres; y primates.

“Muestra” se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra que comprende polinucleótidos, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y similares puede comprender un fluido corporal; una fracción soluble de una preparación celular, o medios en los que se hicieron crecer las células; un cromosoma, un orgánulo o membrana aislados o extraídos de una célula; ADN, ARN o ADNc genómicos, polipéptidos o péptidos en disolución o unidos a un sustrato; una célula; un tejido; una impresión tisular; una huella dactilar, piel o cabello; y similares.

“Tratamiento” es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o de alterar la patología o los síntomas de un trastorno. Por consiguiente, “tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que va a prevenirse el trastorno. En el tratamiento de un tumor (por ejemplo, de cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales, o hacer que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento mediante otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia. Tal como se usa en el presente documento, “mejorado” o “tratamiento” se refiere a un síntoma que se aproxima a un valor normalizado (por ejemplo un valor obtenido en un paciente o individuo sano), por ejemplo, es diferente en menos del 50% de un valor normalizado, preferiblemente es diferente en menos de aproximadamente el 25% de un valor normalizado, más preferiblemente, es diferente en menos del 10% de un valor normalizado, y todavía más preferiblemente, no es significativamente diferente de un valor normalizado tal como se determina usando pruebas estadísticas de rutina. Por ejemplo, el “tratamiento del cáncer” o “células tumorales”, se refiere a uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, incluyendo, (i) ralentización y (ii) detención completa del crecimiento; (2) reducción en el número de células tumorales; (3) mantenimiento del tamaño tumoral; (4) reducción en el tamaño tumoral; (5) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (6) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de metástasis; (7) potenciación de respuesta inmunitaria antitumoral, que

puede dar como resultado (i) mantenimiento del tamaño tumoral, (ii) reducción del tamaño tumoral, (iii) ralentización del crecimiento de un tumor, (iv) reducción, ralentización o prevención de invasión y/o (8) alivio, en cierta medida, de la gravedad o el número de uno o más síntomas asociados con el trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, “un síntoma mejorado” o “síntoma tratado” se refiere a un síntoma que se aproxima a un valor normalizado, por ejemplo, es diferente en menos del 50% diferente de un valor normalizado, preferiblemente es diferente en menos de aproximadamente el 25% diferente de un valor normalizado, más preferiblemente, es diferente en menos del 10% de un valor normalizado, y todavía más preferiblemente, no es significativamente diferente de un valor normalizado tal como se determina usando pruebas estadísticas de rutina.

Una “quimiocina” es una citocina pequeña implicada en la migración y activación de células, incluyendo fagocitos y linfocitos, y desempeña un papel en respuestas inflamatorias.

Una “citocina” es una proteína producida por una célula que afecta al comportamiento de otras células a través de un “receptor de citocina” en la superficie de las células a las que afecta la citocina. Las citocinas producidas por linfocitos se denominan en ocasiones “linfocinas”. Las citocinas también se caracterizan como tipo I (por ejemplo IL-2 e IFN- γ) y tipo II (por ejemplo IL-4 e IL-10).

Mediante el término “modular,” se quiere decir que cualquiera de las actividades mencionadas, por ejemplo, se aumenta, potencia, termina (actúa como agonista), promueve, disminuye, reduce, suprime, bloquea o antagoniza (actúa como agonista). La modulación puede aumentar la actividad en más de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, etc., con respecto a los valores iniciales. La modulación también puede disminuir su actividad por debajo de los valores iniciales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “selectivo para células tumorales” se refiere a los efectos de las composiciones farmacéuticas de coenzima Q10, tales como inhibición del crecimiento tumoral, apoptosis, efectos antiangiogénicos y que no son detectables cuando se aplican a células normales, tal como se describe en detalle en los ejemplos que siguen.

Composiciones de CoQ10

Preferiblemente, las composiciones según la invención comprenden al menos del 1% al 25% p/p de CoQ10, más preferiblemente, entre el 1% y el 20% p/p de CoQ10. En la realización representativa descrita en la sección de ejemplos más adelante, se aplica una formulación tópica de CoQ10 a la piel de un animal portador de tumor para reducir la tasa de crecimiento del tumor. La CoQ10 puede obtenerse de Pure Prescriptions (San Diego, CA) en forma de polvo en cualquier cantidad adecuada (por ejemplo, 1 kilogramo). Para suministrar una composición que contiene CoQ10, puede usarse cualquier portador adecuado. Se usan liposomas como portador. Una formulación liposómica a modo de ejemplo está compuesta de Phospholipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT), Phospholipon 90H (American Lechitin, Stanford, CT), glicerol, hidroxitolueno butilado (BHT), etanol, triglicéridos de cadena media (MCT), lavanda (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y coenzima Q10 (Pure Prescriptions, San Diego, CA). Un ejemplo de un protocolo para preparar esta formulación implica disolver en primer lugar 10 g de Phospholipon 90H, 5 g de Phospholipon 90G, con 1,5 g de MCT, 0,3 g de BHT y 9 ml de etanol a 75°C. A continuación, se disuelven 12 g de coenzima Q 10 en la mezcla. Se añaden 65 ml de tampón fosfato 1 mM (pH 8,2) preparado con agua saturada con nitrógeno, 13,3 g de glicerol y 50 μ l de lavanda. Se combina la mezcla anterior en una mezcladora de alta velocidad a 12.000 RPM para formar una crema. Se almacena la crema a 4°C hasta su uso.

Sujetos

Puesto que sujetos de muchas especies diferentes tienen tumores y son susceptibles de desarrollar un tumor, la invención es compatible con muchos tipos de sujetos animales. Una lista a modo de ejemplo no exhaustiva de tales animales incluye mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, caballos, ganado, perros, gatos y primates tales como monos, simios y seres humanos. Se prefieren aquellos sujetos animales que se sabe que padecen un tumor de cáncer de piel para su uso en la invención. En particular, los pacientes humanos que padecen un tumor de cáncer de piel u otros tumores son sujetos animales adecuados para su uso en la invención. Adaptando los métodos enseñados en el presente documento a otros métodos conocidos en la ciencia médica o veterinaria (por ejemplo, ajustando dosis de sustancias administradas según el peso del animal sujeto), pueden optimizarse fácilmente las composiciones utilizadas en la invención para su uso en otros animales.

Composiciones farmacéuticas y administración a un sujeto

Las composiciones que comprenden CoQ10 se administran por vía tópica. Las composiciones a modo de ejemplo se describen en detalle en los ejemplos que siguen. El principio activo puede comprender, para administración tópica, desde el 0,001 % hasta el 20% p/p, con respecto al peso de la formulación en el producto final, aunque puede comprender hasta el 30% p/p, preferiblemente desde el 1% hasta el 20% p/p de la formulación. Las formulaciones tópicas de la presente invención, comprenden un principio activo junto con uno o más portador(es) aceptable(s) para el mismo y opcionalmente cualquier otro componente(s) terapéutico(s). El/los portador(es) debe(n)

ser “aceptable(s)” en el sentido de ser compatible(s) con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el receptor del/de los mismo(s).

La composición de la invención puede administrarse a un paciente o bien en sí misma, o bien en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con portadores o excipiente(s) adecuado(s). Al tratar a un paciente que muestra un trastorno de interés, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o agentes tales como éstos. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto que da como resultado la mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente.

Puede determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales componentes radica preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada.

Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI_{50} tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC.

La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden escogerse por el médico individual en vista del estado del paciente. (Véase por ejemplo Fingl *et al.*, en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, capítulo 1, pág. 1). Debe observarse que el médico responsable sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o disfunciones orgánicas. A la inversa, el médico responsable sabrá cómo ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no fuera adecuada (evitando la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno oncogénico de interés variará con la gravedad del estado que va a tratarse y con la vía de administración. La gravedad del estado puede evaluarse, por ejemplo, en parte, mediante métodos de evaluación de pronóstico convencionales. Además, la dosis y quizá la frecuencia de dosis, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. Puede usarse un programa comparable al comentado anteriormente en medicina veterinaria.

Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990). Las vías adecuadas pueden incluir, administración transdérmica, vaginal, transmucosa.

Las composiciones descritas anteriormente pueden administrarse a un sujeto en cualquier formulación adecuada. Podrían usarse otros métodos de administración, por ejemplo, administración liposómica o difusión desde un dispositivo impregnado con la composición.

El uso de portadores farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos dados a conocer en el presente documento para la práctica de la invención en dosificaciones adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la invención.

Los agentes destinados a administrarse por vía intracelular pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, tales agentes pueden encapsularse en liposomas, luego administrarse tal como se describió anteriormente. Los liposomas son bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una disolución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan en el interior acuoso. El contenido liposómico está tanto protegido del microentorno externo como, debido a que los liposomas se funden con membranas celulares, se administra de manera eficaz al interior del citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, las moléculas orgánicas pequeñas pueden administrarse directamente por vía intracelular.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr su fin deseado, Véase, por ejemplo, la figura 14. La determinación de las cantidades eficaces está completamente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento. Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos dando lugar a preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de una manera que se conoce por sí misma, por ejemplo,

por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, levitación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel hasta el sitio en el que se requiere el tratamiento, tal como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para la administración a los ojos, oídos o nariz. Las gotas según la presente invención pueden comprender disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles y pueden prepararse disolviendo el principio activo en una disolución acuosa adecuada de un agente bacteriano y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, e incluyendo preferiblemente un agente tensioactivo. La disolución resultante puede clarificarse y esterilizarse entonces mediante filtración y transferirse al recipiente mediante una técnica aséptica. Ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son acetato o nitrato fenilmercúrico (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una disolución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Las lociones según la presente invención incluyen las adecuadas para su aplicación a la piel o los ojos. Una loción ocular puede comprender una disolución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y que puede prepararse mediante métodos similares a los de la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para su aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un agente hidratante tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

Las cremas, pomadas o pastas según la presente invención son formulaciones semisólidas del principio activo para aplicación externa. Pueden prepararse mezclando el principio activo en forma de polvo o finalmente dividido, solo o en disolución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de una maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendras, maíz, cacahuete, ricino u oliva; lanolina o sus derivados, o un ácido graso tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o macrogeles. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo adecuado, tal como un agente tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico, tal como ésteres de sorbitano o derivados de polioxietileno de los mismos. También pueden incluirse agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas y otros componentes tales como lanolina.

La composición puede incluir un sistema tapón, si se desea. Se escogen sistemas tampón para mantener o tamponar el pH de las composiciones dentro de un intervalo deseado. El término "sistema tampón" o "tampón" tal como se usa en el presente documento se refiere a un agente o agentes de soluto que, cuando está(n) en una disolución acuosa, estabiliza(n) tal disolución frente a un cambio principal en el pH (o en la concentración de iones hidrógeno o la actividad) cuando se añaden ácidos o bases a la misma. Se conoce(n) bien el agente o agentes de soluto que es/son por tanto responsable(s) de una resistencia o cambio en el pH desde un valor de pH tamponado de partida en el intervalo indicado anteriormente. Aunque hay incontables tampones adecuados, el fosfato de potasio monohidratado es un tampón preferido.

El valor de pH final de la composición farmacéutica puede variar dentro del intervalo fisiológico compatible. Necesariamente, el valor de pH final es uno que no irrite la piel humana y preferiblemente de manera que se facilite el transporte transdérmico del compuesto activo, es decir CoQ10. Sin infringir esta restricción, el pH puede seleccionarse para mejorar la estabilidad del compuesto CoQ10 y para ajustar la consistencia cuando se requiera. En una realización, el valor de pH preferido es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,4, más preferiblemente de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,5, lo más preferiblemente desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 6,0.

Para los vehículos de administración tópica preferidos, el componente restante de la composición es agua, que está necesariamente purificada, por ejemplo, agua desionizada. Tales composiciones de vehículo de administración contienen agua en el intervalo de más de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 95 por ciento, basado en el peso total de la composición. La cantidad específica de agua presente no es crítica, sin embargo, puede ajustarse para obtener la viscosidad (habitualmente de aproximadamente 50 cps a aproximadamente 10.000 cps) y/o concentración deseadas de los otros componentes. El vehículo de administración tópica tiene preferiblemente una viscosidad de al menos aproximadamente 30 centipoises.

También pueden usarse otros potenciadores de penetración cutánea transdérmica conocidos para facilitar la administración de CoQ10. Son ilustrativos sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y similares; amidas cíclicas tales como 1-dodecilazacicloheptan-2-ona (Azone™, una marca comercial registrada de Nelson Research, Inc.) y similares; amidas tales como N,N-dimetilacetamida (DMA), N,N-dietiltoluidamida, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetildecamida y similares; derivados de pirrolidona tales como N-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, ácido 2-pirrolidon-5-carboxílico, N-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona o ésteres de ácidos grasos de los mismos, 1-lauril-4-metoxycarbonil-2-pirrolidona, N-sebo-alkuilpirrolidonas y similares; polioles tales como propilenglicol, etilenglicol, polietilenglicol, dipropilenglicol, glicerol, hexanotriol y similares; ácidos grasos lineales y ramificados tales como oleico, linoleico, láurico, valérico, heptanoico, caproico, mirístico, isovalérico, neopentanoico, trimetilhexanoico, isoesteárico y similares; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, octanol, oleílico, estearílico, linoleílico y

similares; tensioactivos aniónicos tales como laurato de sodio, laurilsulfato de sodio y similares; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio, cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio y similares; tensioactivos no iónicos tales como los éteres de polioxietileno propoxilados, por ejemplo, Poloxamer 231, Poloxamer 182, Poloxamer 184 y similares, los ácidos grasos etoxilados, por ejemplo, Tween 20, Myrj 45 y similares, los derivados de sorbitano, por ejemplo, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 60 y similares, los alcoholes etoxilados, por ejemplo, lauril éter de polioxietileno (4) (Brij 30), oleil éter de polioxietileno (2) (Brij 93) y similares, lecitina y derivados de lecitina y similares; los terpenos tales como D-limoneno, α -pineno, β -careno, α -terpineol, carvol, carvona, mentona, óxido de limoneno, óxido de α -pineno, aceite de eucalipto y similares.

- 10 También son adecuados como potenciadores de penetración cutánea ácidos orgánicos y ésteres tales como ácido salicílico, salicilato de metilo, ácido cítrico, ácido succínico y similares.

Angiogénesis y enfermedades dependientes de angiogénesis

- 15 Tal como se usa en el presente documento, los términos “inhibidor de angiogénesis”, “inhibición de angiogénesis” o “antiangiogénico” incluyen vasculogénesis y pretenden significar efectuar una disminución en el grado, la cantidad o la tasa de neovascularización. Efectuar una disminución en el grado, la cantidad o la tasa de proliferación o migración de células endoteliales en el tejido es un ejemplo específico de inhibición de angiogénesis.

- 20 El término “composición inhibidora de angiogénesis” se refiere a una composición que comprende CoQ10 que inhibe procesos de angiogénesis mediada por tumores tales como la migración y proliferación de células tumorales, la formación de tubos y que conduce posteriormente a la inhibición de la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes y, en consecuencia, a la inhibición de enfermedades dependientes de angiogénesis, por ejemplo, angiogénesis mediada por tumores. Véanse, por ejemplo las figuras 29A y 29B en las que una composición que comprende CoQ10 inhibe la angiogénesis mediada por tumor en un tejido en comparación con el tejido control en ausencia de cualquier CoQ10. La composición que comprende CoQ10 se describe en detalle en los ejemplos que siguen.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad dependiente de angiogénesis” pretende significar una enfermedad en la que el proceso de angiogénesis o vasculogénesis mantiene o aumenta un estado patológico. En particular, enfermedad dependiente de angiogénesis se refiere a una angiogénesis mediada por tumor.

- La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes o vénulas poscapilares. La vasculogénesis resulta de la formación de nuevos vasos sanguíneos que surgen a partir de angioblastos que son precursores de células endoteliales. Ambos procesos dan como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos y se incluyen en el significado del término enfermedades dependientes de angiogénesis. De manera similar, el término “angiogénesis” tal como se usa en el presente documento pretende incluir la formación *de novo* de vasos tales como los que surgen a partir de vasculogénesis así como los que surgen a partir de ramificación y proliferación de vasos, capilares y vénulas existentes.

- 40 La angiogénesis, incluyendo la vasculogénesis, es un importante proceso fisiológico, sin el cual no se produciría el desarrollo embrionario ni la curación de heridas. Sin embargo, la angiogénesis también se incorpora de manera inapropiada en numerosos estados patológicos como medio para proporcionar suministro adecuado de sangre y nutrientes a las células dentro del tejido afectado. Muchos de estos estados patológicos implican la proliferación o regulación de células aberrantes. Tales estados en los que se cree que la angiogénesis es importante se denominan en el presente documento enfermedades dependientes de angiogénesis. Sin embargo, los métodos de la invención también pueden usarse de manera beneficiosa para inhibir la angiogénesis asociada con procesos fisiológicos normales. Por ejemplo, la inhibición de angiogénesis asociada con el ciclo menstrual puede usarse de manera profiláctica como un método eficaz de control de natalidad. Por tanto, la siguiente descripción en referencia al tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis también es aplicable a la inhibición de respuestas angiogénicas normales cuando existe una necesidad o beneficio profiláctico o terapéutico.

- Las enfermedades dependientes de angiogénesis incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios tales como inflamación inmunitaria y no inmunitaria, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico y psoriasis; trastornos asociados con invasión inapropiada o inoportuna de vasos tales como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, fibroplasia retrolenticular, rubeosis, proliferación capilar en placas ateroscleróticas y osteoporosis; y trastornos asociados con cáncer, incluyendo por ejemplo, tumores sólidos, metástasis tumorales, tumores por vía sanguínea tales como leucemias, angiofibromas, sarcoma de Kaposi, tumores benignos tales como hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piogénicos, así como otros cánceres que requieren neovascularización para soportar el crecimiento tumoral. Ejemplos adicionales de enfermedades dependientes de angiogénesis incluyen, por ejemplo, síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas y granulación de heridas. Los expertos en la técnica conocen otras enfermedades en las que la angiogénesis desempeña un papel en el mantenimiento o la progresión del estado patológico y se pretende que se incluyan de manera similar dentro del significado del término usado en el presente documento. Preferiblemente, enfermedades mediadas por angiogénesis se refiere a angiogénesis inducida por tumor.

Ensayo biológico in vitro de actividad de Inhibición de angiogénesis

Los compuestos de CoQ10 de la presente invención pueden someterse a prueba para determinar su actividad de inhibición de angiogénesis en varios sistemas de ensayo *in vitro* y están completamente dentro del conocimiento de un experto habitual en la técnica. Pueden prepararse u obtenerse comercialmente células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) o células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC), se mezclan a una concentración de 2×10^5 células/ml con fibrinógeno (5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una razón de 1:1 (v/v). Se añade trombina (concentración final de 5 unidades/ml) y se transfiere inmediatamente la mezcla a una placa de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo). Se permite que se forme el gel de fibrina y entonces se añaden factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2) a los pocillos (cada uno a una concentración final de 5 ng/ml) junto con el compuesto de prueba, tal como se describe en los ejemplos que siguen. Se incuban las células a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 días, tiempo en el cual se cuentan las células en cada pocillo y se clasifican o bien como redondeadas, alargadas sin ramificaciones, alargadas con una ramificación o bien alargadas con 2 o más ramificaciones. Los resultados se expresan como el promedio de 5 pocillos diferentes para cada concentración de compuesto. Normalmente, en presencia de inhibidores angiogénicos, las células permanecen o bien redondeadas o bien forman tubos no diferenciados (por ejemplo, 0 ó 1 ramificación). Se reconoce en la técnica que este ensayo es predictivo de la eficacia angiogénica (o de la inhibición de la actividad de angiogénesis) *in vivo* (Grant *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A:327-336 (1991); Min *et al.*, *Cancer Res.* 56:2428-2433 (1996)).

En un ensayo alternativo, se observa formación de tubos de células endoteliales cuando se cultivan células endoteliales en placas recubiertas con matriz Matrigel™, disponible comercialmente de Becton Dickinson de Bedford, Pa. (Schnaper *et al.*, *J. Cell. Physiol.* 165:107-118 (1995)). Se transfieren las células endoteliales (1×10^4 células/pocillo) a placas de 24 pocillos recubiertas con matriz Matrigel™ y se cuantifica la formación de tubos tras 48 horas. Se someten a prueba los inhibidores añadiéndolos o bien al mismo tiempo que las células endoteliales o bien en diversos puntos de tiempo después de eso.

Este ensayo modela la angiogénesis presentando a las células endoteliales un tipo particular de membrana basal, concretamente la capa de matriz en que podría esperarse encontrar primero migración y diferenciación de células endoteliales. Además de factores de crecimiento unidos, los componentes de matriz encontrados en la matriz Matrigel™ (y en las membranas basales *in situ*) o productos proteolíticos de los mismos también pueden ser estimuladores para la formación de tubos de células endoteliales, lo que hace que este modelo sea complementario al modelo de angiogénesis en gel de fibrina.

Adicionalmente, pueden evaluarse las actividades angiogénicas de los compuestos de la presente invención mediante el ensayo de la membrana corioalantoica (CAM) de pollo (Oikawa *et al.*, *Cancer Lett.* 59:57-66 (1991)).

Terapias de combinación

Las composiciones terapéuticas de CoQ10 de la presente invención pueden combinarse con cualquier otro método empleado generalmente en el tratamiento del tumor, enfermedad o trastorno particular que muestre el paciente. Siempre que no se sepa que un enfoque terapéutico particular es perjudicial para el estado del paciente en sí mismo y que no contrarresta significativamente el tratamiento con composición de CoQ10, se contempla su combinación con la presente invención.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, la presente invención puede usarse en combinación con enfoques clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y similares. La invención, por tanto, proporciona terapias combinadas en las que se usan las composiciones terapéuticas de CoQ10 simultáneamente con, antes de o después de tratamiento de cirugía o radiación; o se administran a pacientes con, antes de o después de agentes quimioterápicos, radioterápicos u otros agentes antiangiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o ligandos de coagulación dirigidos.

También se contempla la terapia de combinación para otras enfermedades vasculares. Un ejemplo particular de esto es la hiperplasia prostática benigna (BPH), que puede tratarse con composiciones de CoQ10 en combinación con otros tratamientos puestos en práctica actualmente en la técnica. Por ejemplo, direccionamiento de inmunotoxinas a marcadores localizados dentro de BPH, tal como PSA.

Cuando se usa uno o más agentes en combinación con las composiciones de CoQ10, no se necesita que los resultados combinados sean aditivos a los efectos observados cuando se realiza cada tratamiento por separado. Aunque generalmente son deseables al menos efectos aditivos, sería beneficioso cualquier efecto antitumoral aumentado por encima de una de las terapias individuales. Además, no hay necesidad particular de que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos, aunque esto ciertamente es posible y ventajoso.

Para poner en práctica la terapia antitumoral combinada, simplemente se administraría a un animal un constructo de composición de CoQ10 en combinación con otro agente anticancerígeno de una manera eficaz para dar como

resultado sus acciones antitumorales combinadas dentro del animal. Los agentes se proporcionarían por tanto en cantidades eficaces y durante periodos de tiempo eficaces para dar como resultado su presencia combinada dentro de la vasculatura tumoral y sus acciones combinadas en el entorno tumoral. Para lograr este objetivo, las composiciones de CoQ10 y otros agentes anticancerígenos pueden administrarse al animal simultáneamente, o bien en una única composición o bien como dos composiciones distintas usando vías de administración diferentes.

Alternativamente, el tratamiento mediado por la composición de CoQ10 puede preceder o seguir a un segundo tratamiento con agente anticancerígeno, por ejemplo, en intervalos que oscilan desde minutos hasta semanas. En determinadas realizaciones en las que el agente anticancerígeno y la composición de CoQ10 se aplican por separado al animal, habría que asegurarse de que no transcurriera un periodo de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de manera que el agente anticancerígeno y la composición de CoQ10 pudieran ejercer todavía un efecto combinado ventajosamente sobre el tumor. En tales casos, se contempla que el tumor entraría en contacto con ambos agentes en el plazo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente una semana uno de otro y, más preferiblemente, en el plazo de aproximadamente 12-72 horas uno de otro, siendo lo más preferido un tiempo de retardo de sólo aproximadamente 12-48 horas.

Se conoce bien el uso general de combinaciones de sustancias en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.710.134 da a conocer componentes que inducen necrosis en tumores en combinación con sustancias o "profármacos" no tóxicos. Las enzimas liberadas por los procesos necróticos escinden el "profármaco" no tóxico en el "fármaco" tóxico, lo que conduce a la muerte de las células tumorales. Además, la patente estadounidense n.º 5.747.469 da a conocer el uso combinado de vectores virales que codifican para p53 y agentes que producen daño en el ADN. Puede usarse cualquiera de tales enfoques similares con la presente invención.

En algunas situaciones, puede ser deseable incluso ampliar el periodo de tiempo para el tratamiento de manera significativa, transcurriendo varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas. Esto sería ventajoso en circunstancias en las que se pretende que un tratamiento destruya sustancialmente el tumor, tal como el tratamiento con composición de CoQ10 y se pretende que otro tratamiento evite la micrometástasis o nuevo crecimiento del tumor, tal como la administración de un agente antiangiogénico.

También se prevé que se utilizará más de una administración de o bien la composición de CoQ10 o bien otro agente anticancerígeno. La composición de CoQ10 y los agentes anticancerígenos pueden administrarse de manera intercambiable en días o semanas alternos; o puede administrarse una secuencia del tratamiento con composición de CoQ10, seguido por una secuencia de terapia con agente anticancerígeno. En cualquier caso, para lograr la regresión del tumor usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es administrar ambos agentes en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto antitumoral, independientemente de los momentos de administración.

En lo que se refiere a la cirugía, puede practicarse cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente invención. En relación con la radioterapia, se contempla cualquier mecanismo para inducir daño en el ADN localmente dentro de las células tumorales, tal como radiación γ , rayos X, radiación UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. También se contempla la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales y esto puede usarse en relación con un anticuerpo de direccionamiento u otro medio de direccionamiento.

También se ha demostrado que la terapia con citocinas es un componente eficaz para los regímenes terapéuticos combinados. Pueden emplearse diversas citocinas en tales enfoques combinados. Los ejemplos de citocinas incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF α , TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ . Las citocinas se administran según regímenes convencionales, compatibles con indicaciones clínicas tales como el estado del paciente y la toxicidad relativa de la citocina. También pueden usarse uteroglobinas para prevenir o inhibir metástasis (patente estadounidense n.º 5.696.092).

Composiciones de CoQ10 y agentes quimioterápicos de combinación

En determinadas realizaciones, la composición de CoQ10 de la presente invención puede administrarse en combinación con otro agente quimioterápico. Independientemente del/de los mecanismo(s) subyacente(s), puede usarse una variedad de agentes quimioterápicos en los métodos de tratamiento combinado dados a conocer en el presente documento. Los agentes terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, agentes quimioterápicos tales como, ciclofosfamida (CTX, 25 mg/kg/día, v.o.), taxanos (paclitaxel o docetaxel), busulfano, cisplatino, metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, melfalán, cladribina, vincristina, vinblastina, clorambucilo, tamoxifeno, taxol, etopósido (VP-16), adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), camptotecina, actinomicina D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), combretastatina(s) y derivados y profármacos de los mismos.

Tal como entenderán los expertos habituales en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterápicos serán generalmente entorno a las ya empleadas en terapias clínicas en las que se administran los agentes quimioterápicos solos o en combinación con otros agentes quimioterápicos. A modo de ejemplo únicamente, pueden usarse agentes

tales como cisplatino y otros agentes alquilantes de ADN. El cisplatino se ha usado ampliamente para tratar el cáncer, siendo la dosis eficaz usada en aplicaciones clínicas de 20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. El cisplatino no se absorbe por vía oral y por tanto debe administrarse a través de inyección por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Agentes útiles adicionales incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, la mitosis y la segregación cromosómica. Tales compuestos quimioterápicos incluyen adriamicina también conocida como doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina y similares. Ampliamente usados en una práctica clínica para el tratamiento de neoplasias, estos compuestos se administran a través de inyecciones en bolo por vía intravenosa a dosis que oscilan entre 25-75 mg/m² a intervalos de 21 días para adriamicina y 35-50 mg/m² para etopósido por vía intravenosa o el doble de la dosis intravenosa por vía oral.

También pueden usarse agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de precursores de polinucleótidos. Particularmente útiles son los agentes que se han sometido a pruebas exhaustivas y están fácilmente disponibles. Como tales, se usan preferiblemente agentes tales como 5-fluorouracilo (5-FU) por tejido neoplásico, haciendo que este agente sea particularmente útil para el direccionamiento a células neoplásicas. Aunque es bastante tóxico, el 5-FU, puede aplicarse en un amplio intervalo de portadores, incluyendo los tópicos, usándose sin embargo comúnmente la administración intravenosa con dosis que oscilan entre 3 y 15 mg/kg/día.

Se remite al experto en la técnica a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, capítulo 33, en particular a las páginas 624-652, para ejemplos no limitativos de otros agentes quimioterápicos que pueden usarse en terapias de combinación con las composiciones de CoQ10. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que esté tratándose. El médico responsable para la administración podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Agentes antiangiogénicos

El término "angiogénesis" se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos, generalmente en el interior de un tejido u órgano. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos o animales experimentan angiogénesis sólo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, normalmente se observa angiogénesis en curación de heridas, desarrollo fetal y embrionario y formación del cuerpo lúteo, endometrio y placenta. La angiogénesis no controlada (persistente y/o no regulada) se refiere a diversos estados patológicos y se produce durante el crecimiento tumoral y la metástasis.

Se cree que tanto la angiogénesis controlada como la no controlada transcurren de manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman los vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que recubren la luz de los vasos sanguíneos, sobresalen entonces a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células que migran forman un "brote" del vaso sanguíneo parental, donde las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando el nuevo vaso sanguíneo.

Puesto que se produce angiogénesis persistente, no regulada durante el desarrollo tumoral y la metástasis, los métodos de tratamiento de esta invención pueden usarse en combinación con una cualquiera o más terapias "antiangiogénicas". Agentes antiangiogénicos a modo de ejemplo que son útiles en relación con la terapia combinada se enumeran en la tabla 1. Cada uno de los agentes enumerados en ella es a modo de ejemplo y en modo alguno limitativo.

TABLA 1

Inhibidores y reguladores negativos de angiogénesis

Sustancias

Angiostatina
Endostatina
Fragmento de prolactina de 16 kDa
Péptidos de laminina
Péptidos de fibronectina
Inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMP 1, 2, 3, 4)
Inhibidores del activador de plasminógeno (PAI-1, -2)
Factor de necrosis tumoral alfa
(dosis alta, *in vitro*)
TGF-β1
Interferones (IFN-α, β, γ)

Quimiocinas CXC-ELR: IL-12; SDF-1; MIG; factor plaquetario 4 (PF4-4); IP-10 Trombospondina (TSP) SPARC 2-Metoxiestradiol Proteína relacionada con proliferina Suramina Talidomida Cortisona Fumagilina (AGM-1470; TNP-470) Tamoxifeno Extracto de muérdago coreano (<i>Viscum album coloratum</i>) Retinoides CM101 Dexametasona Factor inhibidor de leucemia (LIF)
--

Un componente determinado preferido para su uso en la inhibición de la angiogénesis es una proteína denominada "angiostatina". Este componente se da a conocer en las patentes estadounidenses 5.776.704; 5.639.725 y 5.733.876. La angiostatina es una proteína que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 38 kD y aproximadamente 45 kD, tal como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras, que contiene aproximadamente las regiones Kringle 1 a 4 de una molécula de plasminógeno. La angiostatina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la de un fragmento de plasminógeno murino que comienza en el aminoácido número 98 de una molécula de plasminógeno murino intacto.

La secuencia de aminoácidos de la angiostatina varía ligeramente entre especies. Por ejemplo, en la angiostatina humana, la secuencia de aminoácidos es sustancialmente similar a la secuencia del fragmento de plasminógeno murino descrito anteriormente, aunque una secuencia de angiostatina humana activa puede comenzar en el número de aminoácido o bien 97 o bien 99 de una secuencia de aminoácidos de plasminógeno humano intacto. Además, puede usarse plasminógeno humano, ya que tiene actividad antiangiogénica similar, tal como se muestra en un modelo tumoral de ratón.

Ya se ha demostrado que determinadas terapias antiangiogénicas producen regresiones tumorales, y la angiostatina es uno de tales agentes. La endostatina, un fragmento COOH-terminal de 20 kDa del colágeno XVIII, el polisacárido bacteriano CM101 y el anticuerpo LM609 también tienen actividad angiostática. Sin embargo, a la luz de sus otras propiedades, se denominan terapias antivasculares o toxinas de vasos tumorales, ya que no sólo inhiben la angiogénesis sino que también inician la destrucción de los vasos tumores a través de mecanismos en su mayor parte no definidos. También se prevé claramente su combinación con la presente invención.

La angiostatina y la endostatina se han convertido en el centro de un intenso estudio, ya que son los primeros inhibidores de la angiogénesis que han demostrado capacidad no sólo para inhibir el crecimiento tumoral, sino también para producir regresiones tumorales en ratones. Hay múltiples proteasas que se ha demostrado que producen angiostatina a partir de plasminógeno incluyendo elastasa, metaloelastasa de macrófago (MME), matrilisina (MMP-7) y gelatinasa B de 92 kDa/colagenasa de tipo IV (MMP-9).

La MME puede producir angiostatina a partir de plasminógeno en tumores y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) regula por incremento la expresión de MME por macrófagos induciendo la producción de angiostatina. El papel de la MME en la generación de angiostatina está apoyado por el hallazgo de que la MME se expresa de hecho en muestras clínicas de carcinomas hepatocelulares de pacientes. Otra proteasa que se cree que puede producir angiostatina es la estromelisin-1 (MMP-3). Se ha demostrado que la MMP-3 produce fragmentos similares a angiostatina a partir de plasminógeno *in vitro*.

CM101 es un polisacárido bacteriano que se ha caracterizado bien en su capacidad para inducir inflamación neovascular en tumores. CM101 se une a y reticula receptores expresados en endotelio desdiferenciado que estimula la activación del sistema del complemento. También inicia una respuesta inflamatoria conducida por citocina que se dirige selectivamente al tumor. Es un agente antipatoangiogénico que regula por disminución la expresión de VEGF y sus receptores.

La trombospondina (TSP-1) y el factor plaquetario 4 (PF4) también pueden usarse en combinación con la presente invención. Ambos son inhibidores de la angiogénesis que se asocian con heparina y se encuentran en gránulos α de plaquetas. TSP-1 es una glicoproteína grande de múltiples dominios de 450 kDa que es constituyente de la matriz extracelular. TSP-1 se une a muchas de las moléculas de proteoglicano encontradas en la matriz extracelular incluyendo, HSPG, fibronectina laminina y diferentes tipos de colágeno. TSP-1 inhibe la migración y proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. TSP-1 también puede suprimir el fenotipo maligno y la tumorigénesis de células endoteliales transformadas. Se ha demostrado que el gen supresor de tumores p53 regula

directamente la expresión de TSP-1 de manera que la pérdida de actividad de p53 produce una reducción espectacular en la producción de TSP-1 y un aumento concomitante en la angiogénesis iniciada por tumor.

5 PF4 es una proteína de 70 aa que es miembro de la familia CXC ELR de quimiocinas que puede inhibir potencialmente la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. PF4 administrada por vía intratumoral o administrada mediante un vector adenoviral puede producir una inhibición del crecimiento tumoral.

10 Los interferones y los inhibidores de metaloproteinasas son otras dos clases de inhibidores angiogénicos que se producen de manera natural que pueden combinarse con la presente invención. La actividad antiendotelial de los interferones se ha demostrado desde principios de los años 1980, sin embargo, el mecanismo de inhibición todavía no está claro. Se sabe que pueden inhibir la migración de células endoteliales y que tienen alguna actividad antiangiogénica *in vivo* que está mediada posiblemente por una capacidad para inhibir la producción de promotores angiogénicos por células tumorales. Los tumores vasculares son sensibles en particular al interferón, por ejemplo, los hemangiomas en proliferación pueden tratarse con IFN α .

15 Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) son una familia de inhibidores que se producen de manera natural de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que también pueden inhibir la angiogénesis y pueden usarse en protocolos de tratamiento combinados con la presente invención. Los MMP desempeñan un papel clave en el proceso angiogénico ya que degradan la matriz a través de la cual las células endoteliales y los fibroblastos migran cuando se está extendiendo o remodelando la red vascular. De hecho, se ha demostrado que un miembro de las MMP, MMP-2, se asocia con el endotelio activado a través de la integrina $\alpha v \beta 3$ presumiblemente para este fin. Si esta interacción se interrumpe por un fragmento de MMP-2, entonces la angiogénesis se regula por disminución y se inhibe el crecimiento de tumores.

25 Hay varios agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis, pudiendo usarse uno cualquiera o más de ellos en combinación con la presente invención. Éstos incluyen AGM-1470/TNP-470, talidomida y carboxiamidotriazol (CAI). En 1990 se encontró que fumagilina es un potente inhibidor de la angiogénesis y desde entonces se han desarrollado los análogos sintéticos de fumagilina, AGM-1470 y TNP-470. Ambos fármacos inhiben la proliferación celular *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. TNP-470 se ha estudiado ampliamente en ensayos clínicos con seres humanos sugiriendo los datos que la administración a largo plazo es óptima.

30 Originalmente se usó talidomida como sedante, pero se encontró que era un potente agente teratógeno y se interrumpió su uso. En 1994 se encontró que la talidomida es un inhibidor de la angiogénesis. La talidomida se usa actualmente en ensayos clínicos como agente anticancerígeno así como tratamiento de enfermedades oculares vasculares.

35 CAI es un inhibidor sintético de la angiogénesis de pequeño peso molecular que actúa como bloqueante de los canales de calcio que impide la reorganización de actina, la migración de células endoteliales y la diseminación sobre el colágeno IV. CAI inhibe la neovascularización a las concentraciones fisiológicas alcanzables y se tolera bien por vía oral por pacientes con cáncer. Los ensayos clínicos con CAI han proporcionado estabilización de la enfermedad en el 49% de los pacientes con cáncer que tienen enfermedad progresiva antes del tratamiento.

45 Se demostró que la cortisona en presencia de heparina o fragmentos de heparina inhiben el crecimiento tumoral en ratones bloqueando la proliferación de células endoteliales. El mecanismo implicado en el efecto inhibidor aditivo del esteroide y la heparina no está claro, aunque se cree que la heparina puede aumentar la captación del esteroide por las células endoteliales. Se ha demostrado que la mezcla aumenta la disolución de la membrana basal por debajo de los capilares recién formados y esto es una posible explicación para el efecto angiostático aditivo. Los conjugados de heparina-cortisol también tienen potente actividad de efectos angiostáticos y antitumorales *in vivo*.

50 También se contemplan inhibidores de la angiogénesis específicos adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, factor antiinvasivo, ácidos retinoicos y paclitaxel (patente estadounidense n.º 5.716.981); AGM-1470 (Ingber *et al.*, Nature, 48:555-557 1990); extracto de cartílago de tiburón (patente estadounidense n.º 5.618.925); oligómeros de poliurea o poliamida aniónica (patente estadounidense n.º 5.593.664); derivados de oxiindol (patente estadounidense n.º 5.576.330); derivados de estradiol (patente estadounidense n.º 5.504.074); y derivados de tiazolopirimidina (patente estadounidense n.º 5.599.813) para su uso como composiciones antiangiogénicas para los usos combinados de la presente invención.

60 También pueden usarse composiciones que comprenden un antagonista de una integrina $\alpha v \beta 3$ para inhibir la angiogénesis en combinación con la presente invención. Tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.766.591, los polipéptidos que contienen RGD y sales de los mismos, incluyendo polipéptidos cíclicos, son ejemplos adecuados de antagonistas de integrina $\alpha v \beta 3$.

65 El anticuerpo LM609 frente a la integrina $\alpha v \beta 3$ también induce regresiones tumorales. Los antagonistas de la integrina $\alpha v \beta 3$, tales como LM609, inducen apoptosis de células endoteliales angiogénicas dejando los vasos sanguíneos quiescentes sin afectar. LM609 u otros antagonistas de $\alpha v \beta 3$ también pueden funcionar inhibiendo la

interacción de $\alpha v\beta 3$ y MMP-2, una enzima proteolítica que se cree que desempeña un importante papel en la migración de células endoteliales y fibroblastos.

La apoptosis del endotelio angiogénico en este caso puede tener un efecto en cascada sobre el resto de la red vascular. La inhibición de la red vascular tumoral de su respuesta completa a la señal del tumor para expandirse puede iniciar, de hecho, el colapso parcial o completo de la red, dando como resultado la muerte de las células tumorales y la pérdida de volumen tumoral. Es posible que la endostatina y la angiostatina funcionen de manera similar. El hecho de que LM609 no afecte a los vasos quiescentes pero pueda producir regresiones tumorales sugiere fuertemente que no sea necesaria dirigirse a todos los vasos sanguíneos en un tumor para el tratamiento con el fin de obtener un efecto antitumoral.

Pueden usarse angiopoyetinas no dirigidas, tales como angiopoyetina-2, en combinación con la presente invención. Los efectos angiogénicos de diversos reguladores implican un bucle autocrino conectado con angiopoyetina-2. Por tanto, se contempla el uso de angiopoyetina-2, angiopoyetina-1, angiopoyetina-3 y angiopoyetina-4 conjuntamente con la presente invención. También pueden usarse otros métodos de intervención terapéutica basados en alterar la señalización a través del receptor de Tie2 en combinación el mismo, tal como usando un receptor de Tie2 soluble que pueda bloquear la activación de Tie2 (Lin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(15):8829-34, 1998). La administración de un constructo de este tipo usando terapia génica adenoviral recombinante ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer y en la reducción de metástasis (Lin *et al.*, 1998).

Composiciones de CoQ10 y terapia de combinación agentes de inducción de apoptosis

El tratamiento con composición de CoQ10 también puede combinarse con métodos de tratamiento que inducen apoptosis en cualquier célula dentro del tumor, incluyendo células tumorales y células endoteliales vasculares tumorales. Aunque muchos agentes anticancerígenos pueden tener, como parte de su mecanismo de acción, un efecto de inducción de apoptosis, se han descubierto, diseñado o seleccionado determinados agentes con este mecanismo como primario, tal como se describe a continuación.

Se han descrito varios oncogenes que inhiben la apoptosis o muerte celular programada. Los oncogenes a modo de ejemplo en esta categoría incluyen, pero no se limitan a, *bcr-abl*, *bcl-2* (distinto de *bcl-1*, *ciclina D1*; números de registro de GenBank M14745, X06487; patentes estadounidenses n.ºs 5.650.491; y 5.539.094) y miembros de la familia incluyendo *Bcl-xl*, *Mcl-1*, *Bak*, *Al*, *A20*. La sobreexpresión de *bcl-2* se descubrió por primera vez en linfomas de células T. *bcl-2* funciona como un oncogén uniéndose e inactivando Bax, una proteína en la ruta apoptótica. La inhibición de la función de *bcl-2* previene la inactivación de Bax y permite que se realice la ruta apoptótica. Por tanto, se contempla la inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos antisentido, para su uso en la presente invención en aspectos en los que se desea la potenciación de la apoptosis (patentes estadounidenses n.ºs 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

En muchas formas de cáncer se han notificado mutaciones en genes supresores de tumores, tales como *p53*. La inactivación de *p53* da como resultado un fallo en promover la apoptosis. Con este fallo, las células cancerosas avanzan en la tumorigénesis, en lugar de quedar destinadas para muerte celular. Por tanto, también se contempla proporcionar supresores de tumores para su uso en la presente invención para estimular la muerte celular. Los supresores de tumores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *p53*, gen de retinoblastoma (*Rb*), tumor de Wilm (*WT1*), bax alfa, enzima convertidora de interleucina-1 β y su familia, gen *MEN-1*, neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*), inhibidor cdk p16, gen del cáncer colorrectal (*DCC*), gen de la poliposis adenomatosa familiar (*FAP*), gen supresor de tumores múltiple (*MTS-1*), *BRCA1* y *BRCA2*.

Se prefieren para su uso los genes *p53* (patentes estadounidenses n.ºs 5.747.469; 5.677.178; y 5.756.455), retinoblastoma, *BRCA1* (patentes estadounidenses n.ºs 5.750.400; 5.654.155; 5.710.001; 5.756.294; 5.709.999; 5.693.473; 5.753.441; 5.622.829; y 5.747.282), *MEN-1* (número de registro de GenBank U93236) y *E1A* de adenovirus (patente estadounidense n.º 5.776.743).

Otras composiciones que pueden usarse incluyen genes que codifican para el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral denominado TRAIL y el polipéptido de TRAIL (patente estadounidense n.º 5.763.223); la proteasa asociada con apoptosis de 24 kD de la patente estadounidense n.º 5.605.826); el factor 1 asociado con Fas, FAF1 (patente estadounidense n.º 5.750.653). También se contempla para su uso en estos aspectos de la presente invención proporcionar la enzima convertidora de interleucina-1 β y miembros de su familia, que también se notifica que estimulan la apoptosis.

También pueden usarse compuestos tales como derivados de carbostirilo (patentes estadounidenses n.ºs 5.672.603; y 5.464.833); péptidos apogénicos ramificados (patente estadounidense n.º 5.591.717); inhibidores de fosfotirosina y análogos de fosfotirosina no hidrolizables (patentes estadounidenses n.ºs 5.565.491; y 5.693.627); agonistas de receptores retinoides RXR (patente estadounidense n.º 5.399.586); e incluso antioxidantes (patente estadounidense n.º 5.571.523). También pueden unirse inhibidores de tirosina cinasa, tales como genisteína, a ligandos que se seleccionan como diana un receptor de la superficie celular (patente estadounidense n.º 5.587.459).

Cantidades eficaces

Las composiciones descritas anteriormente se administran preferiblemente a un sujeto en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz es una cantidad que puede producir un resultado deseable en un animal o célula tratada (por ejemplo, inducir apoptosis o afectar a la mitosis en una célula en el animal o en un cultivo). Tal como se conoce bien en las técnicas médica y veterinaria, la dosificación para cualquier animal depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del animal particular, el área de superficie corporal, la edad, la composición particular que va a administrarse, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando de manera concurrente. Se espera que una dosificación apropiada para la administración tópica de las composiciones de la invención estaría en el intervalo de aproximadamente 1,5 – 4,0 mg de CoQ10/kg de peso corporal (por ejemplo, 200 mg para sujetos que oscilan entre 110 y 300 lb). Una cantidad eficaz para su uso con una célula en cultivo también variará, pero puede determinarse fácilmente de manera empírica (por ejemplo, añadiendo diversas concentraciones a la célula y seleccionando la concentración que mejor produce el resultado deseado). Se espera que una concentración apropiada estaría en el intervalo de aproximadamente 5 - 200 μ M.

Agentes de base tales como cremas, aceites, geles o pomadas son adecuados para la aplicación tópica. La elección de un agente de base inactivo adecuado para su uso en la invención dependerá del agente activo con el que va a combinarse. El experto habitual conocerá los agentes de base adecuados. Alternativamente, puede consultarse Remington's Pharmaceutical Sciences, the Physician Desk Reference (PDR) u otros manuales enumerados anteriormente para obtener esta determinación.

Los ejemplos de agentes de base inactivos o componentes incluyen, por ejemplo, lanolina, pomada hidrófila, pomada blanca, pomada amarilla, pomada de polietilenglicol, vaselina, vaselina hidrófila, vaselina blanca, vaselina acuosa rosa, escualeno, aceite vegetal hidrogenado (tipo II), gel de ultrasonidos, gel de lecitina plurónica (PLO), crema.

El término "vaselina" tal como se usa en el presente documento significa pomada de vaselina, gel de vaselina o crema de vaselina, estando todos ellos disponibles comercialmente. Está completamente dentro del dominio del experto farmacéutico habitual determinar qué forma de vaselina es la más apropiada.

Se prefieren las disoluciones de base estériles para las vías de administración oftálmicas. La administración puede ser, por ejemplo, subcutánea o transdérmica. Los productos farmacéuticos combinados, preferiblemente los deseados para vías de administración oftálmicas, pueden prepararse y administrarse en agentes inactivos que son farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, un portador farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los agentes activos y que es compatible con los sistemas biológicos de un tejido u organismo. El portador fisiológicamente aceptable debe ser estéril para la administración *in vivo*. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que se conocen bien en la técnica. Las características del portador dependerán de la vía de administración. En general, los expertos habituales en la técnica conocen bien los portadores o agentes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, las disoluciones estériles adecuadas incluyen gotas oftálmicas de ciclosporina.

Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros para preparar estas composiciones farmacéuticas alternativas sin recurrir a experimentación excesiva.

Los agentes inactivos también pueden incluir componentes que funcionan para conservar la integridad de la formulación combinada. Esta última categoría de agentes inactivos incluye, por ejemplo, agentes antiespumantes. Agentes antiespumantes son agentes que funcionan para eliminar el aire no deseado atrapado en una composición, quizá durante el mezclado o la agitación. Los ejemplos de otros agentes antiespumantes útiles en las composiciones de la invención incluyen bisfenilhexameticona, dimeticona, dimeticonol, hexametildisiloxano, alcohol hexílico, alcohol isopropílico, destilados de petróleo, fenetil disiloxano, fenil trimeticona, polisilicona-7, alcohol propílico, dimetilsilicato de sílice, silicato de sílice, tetrametildecindiol y trimetilsiloxilicato. Un agente antiespumante preferido es simeticona. La simeticona es una mezcla de aproximadamente el 90% de dimeticona y el 10% de dióxido de silicona (p/p). La simeticona se usa ampliamente como agente antigás en productos farmacéuticos tales como GAS-X™ (simeticona), MAALOX™ (hidróxido de magnesio/hidróxido de aluminio), MYLANTA™ (aluminio, magnesio-simeticona), PHAZYME™ (simeticona), GENAZYME™ (simeticona) y MYLICON™ (simeticona) en gotas. La simeticona puede usarse como agente antiespumante en cualquiera de las formulaciones abarcadas por la invención.

Otros agentes inactivos que pueden incluirse en las formulaciones de la invención incluyen estabilizantes tales como ácido cítrico, antioxidantes tales como metabisulfito de sodio y conservantes tales como metil o propilparabeno.

Otra clase de agentes de inactivos son los agentes de suspensión. Los agentes de suspensión son agentes que facilitan la suspensión y en algunos casos la disolución de un agente activo en una base. Generalmente, los agentes

de suspensión garantizan el mezclado más uniforme de los componentes activos y de base. Con el fin de administrar una dosis más uniforme de un producto farmacéutico combinado a un paciente, los componentes combinados deben combinarse de manera apropiada y homogénea. Si el agente activo está presente como un polvo, a menudo es difícil de lograr una dispersión uniforme usando la forma tradicional de combinación.

Una subcategoría de agentes de suspensión son los solubilizantes. Los solubilizantes son agentes que facilitan la disolución de un agente sólido o, en algunos casos, de un agente semisólido en un agente inactivo de base. En algunas realizaciones de la invención, un agente activo en forma sólida puede disolverse en un agente de suspensión, antes de mezclarlo con el agente de base. A la inversa, el agente de suspensión y el agente de base pueden envasarse previamente juntos, particularmente si la preocupación es garantizar la combinación uniforme del agente activo dentro del componente de base más que la pérdida del agente activo sólido (es decir, en polvo). Todavía en otras variaciones, el agente de suspensión puede mezclarse previamente con el agente inactivo de base.

Agentes de suspensión adecuados útiles en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, glicerina, hexilenglicol, propilenglicol, sorbitol, goma arábiga, colesterol, dietanolamina (adyuvante), monoestearato de glicerilo, alcoholes de lanolina, lecitina, mono y diglicéridos, monoetanolamina (adyuvante), ácido oleico (adyuvante), alcohol oleílico (estabilizante), Poloxamer, estearato de polioxietileno 50, aceite de ricino de polioxilo 35, aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40, oleíl éter de polioxilo 10, cetoestearil éter de polioxilo 20, estearato de polioxilo 40, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, diacetato de propilenglicol, monoestearato de propilenglicol, laurilsulfato de sodio, estearato de sodio, monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, ácido esteárico, trolamina, cera emulsionante, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, docusato sódico, nonoxinol 9, nonoxinol 10, octoxinol 9, estearato de polioxilo 50 y tiloxapol.

Todavía otros agentes de suspensión incluyen agentes humectantes y de humectación. Los agentes humectantes son agentes que retienen la humedad. Los ejemplos de agentes humectantes incluyen, pero no se limitan a, glicerina, hexilenglicol, propilenglicol y sorbitol. Las cantidades de agentes activos de base y no de base también dependerán del producto farmacéutico combinado particular que va a prepararse. Los agentes de base pueden proporcionarse en cantidades que corresponden a las preparaciones combinadas finales que contienen del 0,5% al 99,99% de agente de base, o bien en peso o bien en volumen. En realizaciones preferidas, la concentración final del agente de base es del 20%-80%. En incluso realizaciones más preferidas, la concentración final del agente de base es del 40%-80%.

Generalmente, las cantidades de agentes no de base serán suficientes para proporcionar formulaciones finales en las que cada agente inactivo no de base representa el 0,01%-50% (p/p) de la composición. Los agentes de suspensión pueden representar el 1%-50% (p/p) de la formulación final. Preferiblemente, los agentes de suspensión representarán el 1%-40% e incluso más preferiblemente, representarán el 5%-30% de la formulación final. Los agentes antiespumantes pueden representar del 0,01% al 20% (p/p) de la formulación final. Más preferiblemente, los agentes antiespumantes representan del 0,05% al 10% de la formulación final e incluso más preferiblemente, representan del 0,1% al 5% de la formulación final.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención sin limitarla de ese modo.

Ejemplo 1- Materiales y métodos para ensayo de apoptosis

Las líneas usadas en el ensayo fueron SK-Mel28 y nFIB. Se sembraron las células (SK-Mel28 y nFIB) (5×10^4 células/pocillo) en pocillos que contenían o bien únicamente medio o bien medio con tratamiento y se colocaron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y en condiciones humidificadas durante 48 horas. Cada condición se realizó por duplicado y se sometió al siguiente protocolo:

Análisis de apoptosis según protocolo del protocolo de anexina-VPE de BD Pharmingen

Los reactivos incluyen anexina V-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), 7-AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA), tampón de unión (10x: Hepes 0,1 M/NaOH, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) [diluido hasta 1x (9 ml de PBS y 1 ml de tampón de unión) para su uso en el experimento] (BD Pharmingen, San Diego, CA), tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) y medios deseados.

Se añaden 0,5 ml de tripsina a cada pocillo, se retira la tripsina tras aproximadamente 10 segundos y se añaden 0,5 ml de tripsina a cada pocillo. Se colocan los pocillos en una incubadora, se observa el nivel de separación al microscopio tras 4 minutos y se golpean suavemente los lados y el fondo para ayudar a la separación. Cuando las células se separan, se neutraliza con 5 ml de medio complementado con suero. Se transfiere la disolución de células a tubos de centrifuga, se centrifugan las células 2000 RPM durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante, se resuspenden en 6 ml de PBS y dividen 6 ml en tres tubos de centrifuga (2 ml en cada uno). Se centrifugan las células 2000 RPM durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante, se resuspenden en 100 ml de mezcla de tampón

de unión, se añaden 50 µl de anexina V-PE y 50 µl de 7-AAD en cada tubo de centrifuga y se agitan con vórtex y se colocan en la oscuridad durante 15 minutos. Se añaden 350 µl de tampón de unión a cada tubo y se realiza el análisis usando el citómetro de flujo.

- 5 También se crea una referencia usando células recién cultivadas a partir de un matraz. Se subcultivaron las células y se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente, se resuspendieron en tampón de unión 1x a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se transfirieron 100 µl de la suspensión celular a tres tubos de ensayo para obtener un total de 1×10^5 por tubo. Un tubo sirvió como control negativo sin tinción introducida. Otro se tiñó sólo con anexina V-PE mientras que el último se tiñó sólo con 7-AAD. Se colocaron 50 µl de disolución de tinción en cada uno de los tubos.
- 10 Se colocaron entonces estos tubos en la oscuridad durante 15 minutos, tiempo tras el cual se añadieron a cada uno 350 µl de tampón de unión. Entonces se sometieron a análisis mediante citometría de flujo antes de las células tratadas y control.

Experimento 1: El efecto de la coenzima Q10 en el nivel de apoptosis en células de cáncer de mama humano

MCF-7 Control	MCF-7 Control	MCF-7 Control
100 µM CoQ10	100 µM CoQ10	100 µM CoQ10

- Se sembraron 50.000 células/pocillo

-Se compara con la referencia de 100.000 células/muestra en el ensayo de apoptosis (anexina PI) tras 72 horas

20 *Experimento 2: El efecto de vehículo de 2-propanol en el nivel de apoptosis en células de melanoma*

SK-MEL 28 Control	SK-MEL 28 Control	SK-MEL 28 Control
Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)	Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)	Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)

-Se sembraron 50.000 células/pocillo

-Se compara con la referencia de 100.000 células/muestra en el ensayo de apoptosis (anexina PI) tras 48 horas.

Experimento 3: El efecto de vehículo de 2-propanol en el nivel de apoptosis en fibroblastos neonatales

nFIB (P) 6 Control	nFIB (P) 6 Control	nFIB (P) 6 Control
Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)	Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)	Volumen equivalente si 50 µM de CoQ10 (1% de 2-propanol)

-Se sembraron 50.000 células/pocillo

-Se compara con la referencia de 100.000 células/muestra en el ensayo de apoptosis (anexina PI) tras 48 horas.

35 *Preparación de medio DMEM/F12*

Materiales:

- Medio DMEM/F12 (n.º de catálogo 11330-032 Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)

- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 1 ml y 25 ml para usarse con PipettMan

- Complemento de FBS (suero bovino fetal) (Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)

45 - PSA (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) – complemento de agentes antimicrobianos (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR)

Procedimientos:

50 Se transfiere una cantidad apropiada de FBS a medio DMEM/F12 (por ejemplo, 50 ml de FBS en 500 ml de medio para una concentración sérica del 10%). Se añade la cantidad apropiada de PSA para obtener una disolución con

una concentración final de penicilina G 100 U/ml, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml (por ejemplo, 1 ml de PSA 500x en 500 ml de medio). Se mezcla pipeteando e invirtiendo la botella. Se almacena a 4°C hasta su uso.

5 *Preparación de medio EpiLife*

Materiales:

- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 5 ml, 10 ml para usarse con PipettMan
- Medios EpiLife (M-EPI-500, Cascade Biologicals)
- PSA (500X de penicilina-estreptomicina-anfotericina B)- complemento de agentes antimicrobianos (R-004-10 Cascade Biologics)
- EDGS (complemento de crecimiento epidérmico) (S-012-S Cascade Biologics)

Procedimientos:

- Se transfiere un vial de EDGS (5 ml) y PSA (1 ml) a medio EpiLife dando como resultado penicilina G 100 U/ml, sulfato de esteptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml (por ejemplo 1 ml de PSA 500x en 500 ml de medio). Se mezcla pipeteando e invirtiendo. Se almacena a 4°C hasta su uso.

Protocolo de creación de una disolución homogénea de Q10 en medios

Materiales:

- Puntas de pipeta estériles de poliestireno – 200-1000 µM para usarse con pipetas automáticas
- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 10 ml para usarse con PipettMan
- Tubos de centrifuga de 15 ml
- Medios
- Coenzima Q10 (Compound Solutions, Inc., Escondido, CA)
- 2-propanol (número de catálogo 9083-3, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsbury, NJ)

Procedimientos:

- Se recupera la disolución madre de Q10 del almacenamiento a 20°C y se pesan aproximadamente 4,4 mg. Se transfiere la Q10 a un tubo de centrifuga de 25 ml. Se añade 1 ml de 2-propanol al tubo de centrifuga. Se agita con vórtex y se sumerge en un baño de agua caliente (55°C) para promover la disolución. Se añaden 9 ml de medio al tubo de centrifuga. Se agita con vórtex y se sumerge en un baño de agua caliente (55°C) si es necesario para crear una disolución homogénea. Esto da como resultado una disolución de Q10 500 µM. Se realizan diluciones en serie para obtener concentraciones de tratamiento.

Protocolo de descongelación de células

Materiales:

- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 1 ml, 10 ml para usarse con PipettMan
- Matracas de cultivo celular de 75 m²
- Tubos de centrifuga de 15 ml

Procedimientos:

- Se aclimatan los reactivos a 37°C en un baño de agua. Se retiran las células del tanque de nitrógeno líquido. Se mantiene el vial sujeto en la palma para iniciar la descongelación. Se sumerge en un baño de agua a 37°C hasta que se funde completamente. Se transfieren las células a un tubo de centrifuga de 15 ml con 10 ml de medio de crecimiento. Se mezcla pipeteando. Se centrifuga a 2500 RPM durante 8 minutos. Se aspira el sobrenadante. Se resuspende el sedimento con medio apropiado. Se mezcla mediante agitación con vórtex y se pipetea para homogeneizar la suspensión celular. Se transfiere a un matraz/matracas de cultivo celular de 75 cm².

Protocolo de subcultivo de células

Materiales:

- 5 - Puntas de pipeta estériles siliconadas – 5 ml, 10 ml para usarse con PipetteMan
- Matraces de cultivo celular de 75 cm² (T75)
- 10 - Placas de cultivo tisular de 6 pocillos
- Tubos de centrifuga de 15 ml
- Medios
- 15 - Tripsina al 0,05% (número de catálogo 25-052-C1- tripsina 1X-EDTA, Cellgro by Mediatech, Herndon, VA)

Procedimientos:

- 20 Se aclimatan los reactivos a 37°C en un baño de agua. Se retira el medio de los matraces de cultivo celular (las células están listas para el subcultivo cuando son confluentes en aproximadamente el 85%). Se ceban añadiendo 1-2 ml de tripsina al matraz durante 30 segundos. Se retira la tripsina del matraz. Se añaden 5 ml de tripsina al matraz. Se coloca el matraz en la incubadora a 37°C durante aproximadamente 4 minutos. Se retira y se observa el grado de separación con el microscopio. Si es necesario, se golpea suavemente el matraz para ayudar en la separación. Se añaden 5 ml de medio que contenía suero. Se mezcla pipeteando y lavando el matraz con suspensión celular. Se transfiere la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se agita con vórtex el tubo de centrifuga. Se centrifuga a 2500 RPM durante 8 minutos. Se aspira el sobrenadante. Se resuspende el sedimento en medio apropiado. Se crea una suspensión celular homogénea pipeteando y agitando con vórtex. Se siembran las células en nuevos matraces T75 o en placas de pocillos para la experimentación.

Protocolo de recuento de células

Materiales:

- 35 - Contador de células y partículas Beckman Coulter® Z1 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)
- Viales de contador Coulter (Beckman Coulter, Inc.)
- Diluyente Isoton II (n.º 8546719, Beckman Coulter)
- 40 - Agente de limpieza Coulter CLENZ (n.º 8546929, Beckman Coulter)
- Puntas de pipeta estériles de poliestireno – 20-200 µM, 200-1000 µM para usarse con pipetas automáticas

Procedimientos:

- Tras el subcultivo (según el protocolo de subcultivo de células descrito anteriormente), se pipetea la suspensión celular de volumen deseado para su recuento (0,25-1 ml) en un vial de contador Coulter (Beckman, Inc.) usando una pipeta automática. Asegurarse que el contador de células y partículas Beckman Coulter® Z1 está limpio usando el agente de limpieza Coulter CLENZ (Beckman, Inc., Fullerton, CA) para lavar. Lavar el aparato una vez con el diluyente Isoton II. Añadir diluyente Isoton II al vial que contiene las células para obtener un volumen total de 10 ml. Usar el modo de salida del aparato para contar las células dos veces para garantizar la exactitud. Realizar un promedio de los recuentos juntos y calcular el número de células totales por volumen.

Protocolo de realización de experimentos in vitro

Materiales:

- 60 - Puntas de pipeta estériles de poliestireno – 20-200 µM, 200-1000 µM para usarse con pipetas automáticas
- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 5 ml, 10 ml para usarse con PipettMan
- Matraces de cultivo celular de 75 cm²
- 65 - Placas de cultivo tisular de 6 pocillos

- Tubos de centrífuga de 15 ml

- Viales de contador Coulter (Beckman Coulter, Inc.)

5 - Tripsina al 0,05% (número de catálogo 25-052-C1- tripsina 1X-EDTA, Cellgro)

Procedimientos:

10 Se aclimatan los reactivos a 37°C en un baño de agua. Se prepara una disolución madre de Q10 según el protocolo descrito anteriormente para crear una disolución homogénea de Q10 en medios. Se realizan diluciones en serie para obtener concentraciones deseadas. Se colocan 2 ml de medios en los pocillos respectivos. Se subcultivan los
matraces según el protocolo descrito anteriormente para el subcultivo de células. Se resuspenden las células sólo
con medio suficiente para crear una suspensión celular homogénea (aproximadamente 5 ml). Se determina la
concentración de células según el protocolo descrito anteriormente para el recuento de células. Se diluye la
15 suspensión celular de modo que la cantidad deseada de células que va a sembrarse está contenida en 50-100 µL.
Se siembra la cantidad deseada de células en cada pocillo. Se incuban a 37°C, 5% de CO₂ y en condiciones
humidificadas durante la duración deseada. Se aspiran los medios de los pocillos. Se colocan 0,5 ml de tripsina en
cada pocillo. Se incuban durante aproximadamente 4 minutos. Se comprueba el grado de separación con el
microscopio. Se agita, se golpean suavemente los lados y se dan toques suaves en el fondo para ayudar a la
20 separación si es necesario. Se neutraliza la tripsina con 0,5 ml de medio. Se pipetea para ayudar en la separación
de células y la rotura de agrupaciones. Se retiran 0,5 ml de suspensión celular y se colocan en viales de contador
Coulter (Beckman Coulter, Inc.). Se cuentan las células según el protocolo descrito anteriormente para contar
células.

25 *Protocolo de inoculación de animales*

Materiales:

30 - Disolución tampón fosfato (PBS) (Gibco-Invitrogen Corp, Grand Island, NY)
- Puntas de pipeta estériles de poliestireno – 20-200 µM, 200-1000 µM para usarse con pipetas automáticas
- Puntas de pipeta estériles siliconadas – 5 ml, 10 ml para usarse con PipettMan
35 - Matraces de cultivo celular de 75 cm²
- Tubos de centrífuga de 15 ml
- Viales de contador Coulter (Beckman Coulter Inc.)
40 - Tripsina al 0,05% (número de catálogo 25-052-C1- tripsina 1X-EDTA, Cellgro)
- Tubos de centrífuga (2 ml)
45 - Anestésico (Aventin)

Procedimientos:

50 Se subcultivan matraces según el protocolo de subcultivo de células descrito anteriormente. Tras aspirar el
sobrenadante, se combinan los sedimentos de cada matraz diluidos ligeramente con PBS con una pipeta de 5 ml.
Se diluye la suspensión celular final para que contenga aproximadamente diez millones de células por 100 µl. Se
transfiere la suspensión celular a tubos de microcentrifuga (2 ml). Se coloca en hielo inmediatamente y se deja en
hielo hasta que se inyecta. Se anestesia a ratones a través de una inyección intraperitoneal con 0,3 cc de Aventin.
Se inocula a cada animal por vía subcutánea 0,1 cc de suspensión celular por sitio. Se transfiere cualquier célula
55 restante a un tubo de centrífuga de 15 ml. Se enrasa a 10 ml con medio. Se centrifuga a 2500 RPM durante
8 minutos. Se aspira el sobrenadante. Se añaden 10 ml de medios al tubo de centrífuga. Se crea una suspensión
celular homogénea pipeteando y agitando con vórtex. Se siembran las células en un matraz T75 para garantizar la
viabilidad celular experimental.

60 *Ejemplo 2 – Efecto de una formulación tópica de coenzima Q10 en tumores SK-MEL28 en ratones*

Se indujeron tumores de melanoma en ratones mediante la inyección de SK-MEL28 en la capa subcutánea. El
estudio con animales consistió tanto en un grupo control como en uno de tratamiento, conteniendo cada uno cuatro
ratones. Se inocularon a los ratones dos tumores y el gráfico de la figura 14 representa la masa media resultante
65 para los tumores en cada ratón. Se aplicó una formulación tópica de coenzima Q10 (10%) a los tumores en el grupo
de tratamiento diariamente durante un periodo de 30 días. Tras esto, se extirparon los tumores y se determinó la

masa. La diferencia en la masa media global en el grupo de tratamiento fue significativa en comparación con el control ($P < 0,05$).

Ejemplo 3-Preparación de crema tópica de CoQ10

Reactivos:

- Phospholipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT)

- Glicerol

- BHT

- Etanol

- MCT

- Lavanda (Sigma-Aldrich)

- CoQ10 (Pure Prescriptions, San Diego, CA)

Procedimiento:

Se disolvieron 6 g de Phospholipon 90G (American Lechitin, Stanford, CT) en una mezcla de 5,8 g de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,2 g de BHT (Sigma-Aldrich), 4 ml de etanol (Sigma-Aldrich) y 18 g de MCT (Sigma-Aldrich) a 60°C. Se disolvieron 20 g de CoQ10 (Pure Prescriptions) en la mezcla resultante. Se prepararon 90 ml de tampón fosfato 1 mM (pH 8,2) con agua saturada con nitrógeno y se añadieron 0,2 ml de lavanda (Sigma-Aldrich) y se combinó la mezcla en una mezcladora de alta velocidad a 12.000 RPM para formar una crema. Se almacenó la crema a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 4: Análisis de apoptosis para tinción con JC-1

Se midió la apoptosis usando un colorante de membrana mitocondrial JC-1, cloruro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-bencimidazolcarbocianina (Molecular Probe, Eugene, OR). Los tratamientos consistieron en medios DMEM-F12 complementados con PSA 1X, FBS al 5% y se prepararon concentraciones de 0, 50, 100 y 200 μ M de coenzima Q10 en placas de cultivo tisular de 60 x 15 mm (Costar-Cambridge, MA). Se sembraron células PC-3 a 500.000 células por placa y se incubaron durante 24 horas. Se sometieron las células a tripsinización usando 2 ml de tripsina-EDTA y se sometieron a centrifugación a 2.500 RPM durante 8 minutos. Se resuspendieron en 1 ml de medio F12 de Ham que carecía de suero y rojo fenol (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR) y se colocaron inmediatamente en hielo. Se preparó una disolución madre 1 mg/ml de JC-1 usando DMSO estéril y se añadieron 10 ml a cada suspensión celular mientras se agitaba con vórtex suavemente. Se incubaron las células a 37°C durante 15 min., se diluyeron con 4 ml de medio F12 de Ham y se centrifugaron a 600 RPM durante 7 min. Se resuspendieron en 5 ml de PBS frío (Gibco-Grand Island, NY), se centrifugaron las células de nuevo en 600 RPM durante 7 min. Entonces se suspendió el sedimento celular en 1 ml de PBS frío y se transfirió a tubos de citometría de flujo con filtro de nailon en la parte superior cubiertos con papel de aluminio para evitar la penetración de luz. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo para determinar los cambios en la captación de colorante fluorescente. El monómero JC-1 muestra fluorescencia verde ($\lambda_{cm} = 527$ nm) mientras que los agregados J muestran fluorescencia roja ($\lambda_{cm} = 590$ nm). Las mitocondrias permeabilizadas acumulan el colorante monomérico JC-1 antes de y durante la apoptosis.

REIVINDICACIONES

1. Composición liposómica tópica, que comprende coenzima Q10, Phospholipon 90, glicerol, hidroxitolueno butilado (BHT), etanol, triglicéridos de cadena media (MCT) y lavanda.
2. Composición liposómica tópica según la reivindicación 1, en la que el Phospholipon 90 es Phospholipon 90G.
3. Composición liposómica tópica según la reivindicación 1, en la que el Phospholipon 90 es Phospholipon 90H.
4. Composición liposómica tópica según la reivindicación 1, en la que el Phospholipon 90 comprende Phospholipon 90G y Phospholipon 90H.
5. Composición liposómica tópica según la reivindicación 1, en la que la composición comprende entre el 1% y el 25% (p/p) de coenzima Q10.
6. Composición liposómica tópica según la reivindicación 1, en la que la composición comprende entre el 1% y el 20% (p/p) de coenzima Q10.
7. Uso de una composición liposómica tópica que comprende coenzima Q10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la composición comprende desde el 1% hasta el 25% p/p de coenzima Q10.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que la composición comprende del 1% al 20% p/p de coenzima Q10.
10. Uso según la reivindicación 7, en el que la composición que comprende la coenzima Q10 se formula como una crema tópica.
11. Uso según la reivindicación 7, en el que se administra una cantidad terapéutica eficaz de la composición de coenzima Q10 con uno o más agentes quimioterápicos.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que el agente quimioterápico puede coadministrarse, preceder o administrarse tras la composición que comprende una cantidad terapéutica eficaz de coenzima Q10.
13. Uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en ciclofosfamida (CTX, 25 mg/kg/día, v.o.), taxanos (paclitaxel o docetaxel), busulfano, cisplatino, ciclofosfamida, metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, melfalán, cladribina, vincristina, vinblastina y clorambucilo.
14. Uso según la reivindicación 7, en el que la composición comprende del 0,01% al 30% (p/p) de CoQ10.
15. Uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, melanoma, carcinoma y sarcoma.
16. Uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer es melanoma.
17. Uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer es carcinoma.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que el carcinoma es carcinoma de células escamosas.
19. Uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hígado y cáncer de huesos.

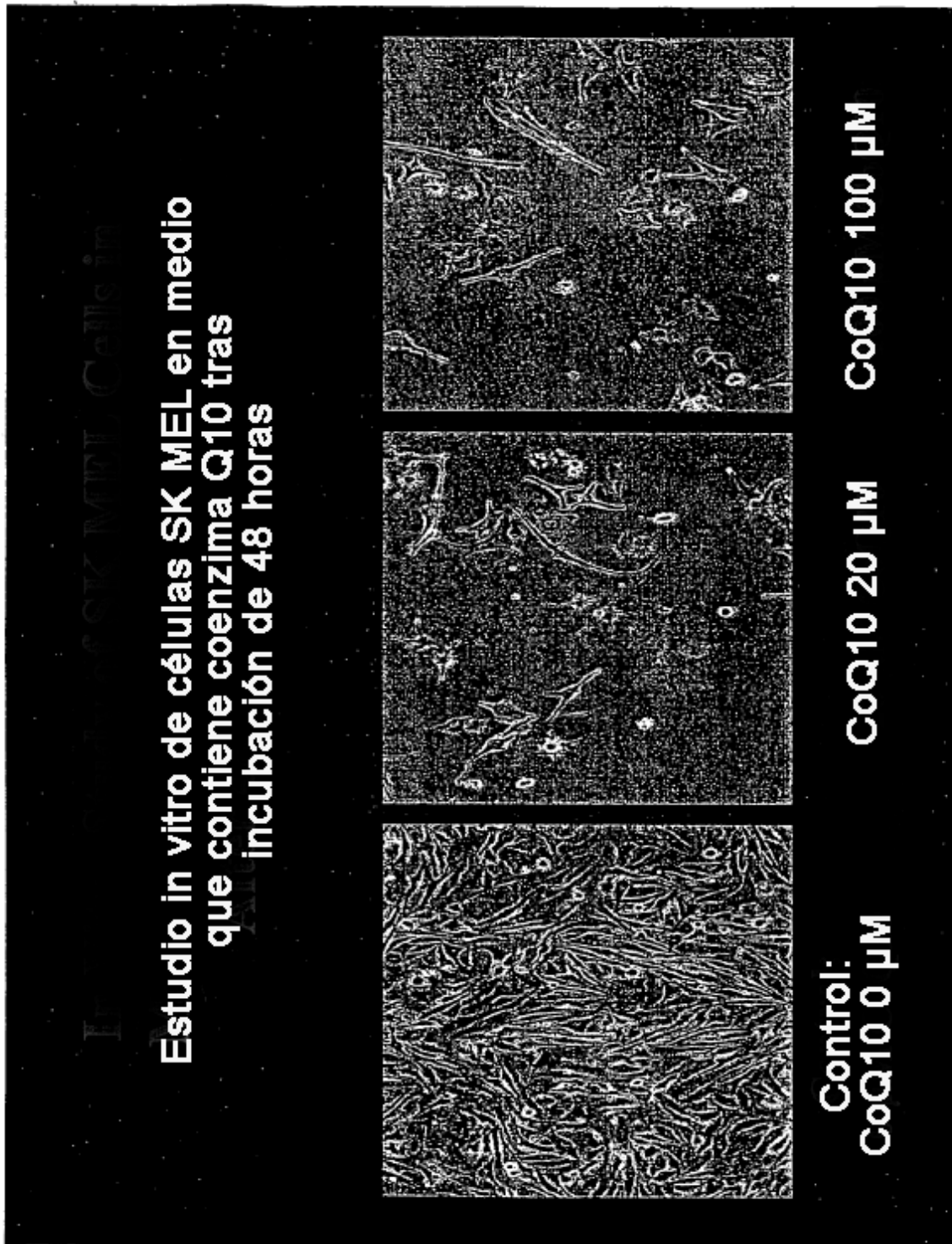
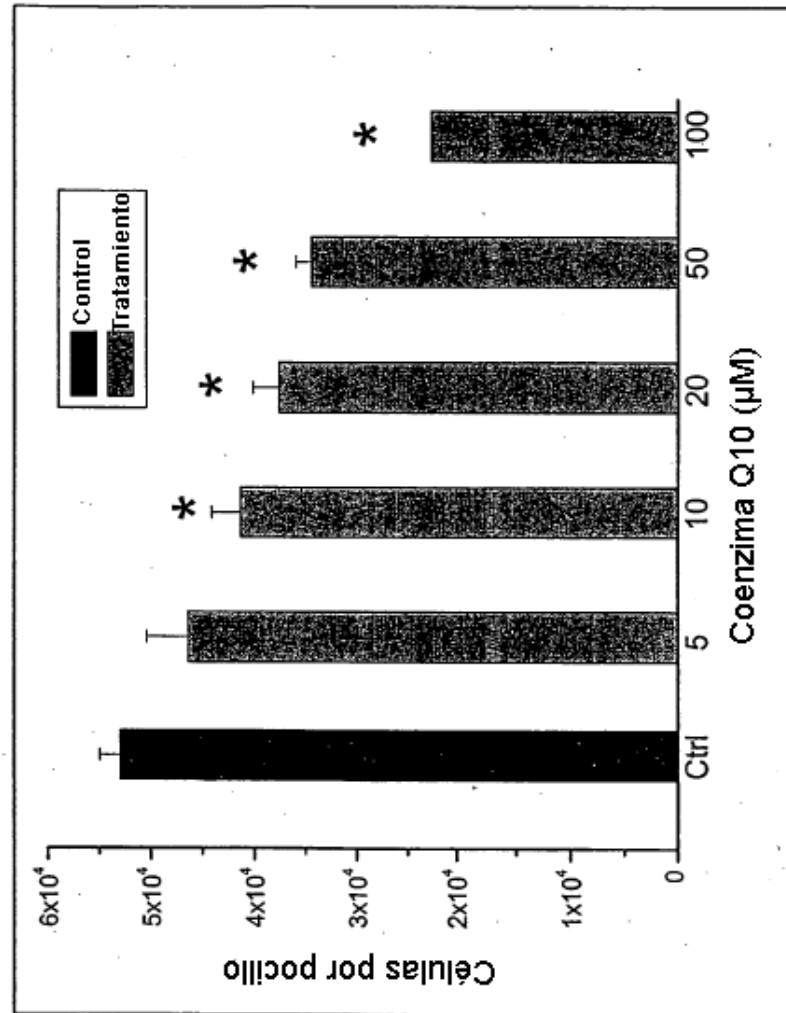


FIG. 1

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular SKMEL28 de melanoma humana

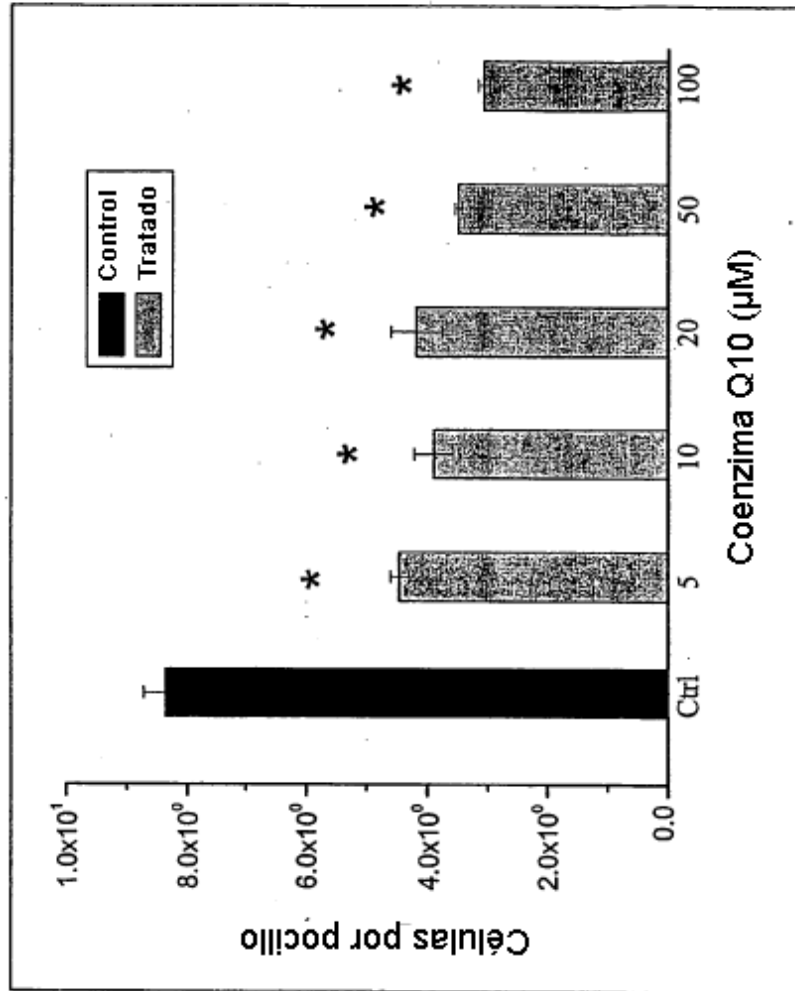


Tras 36 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 2

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular SKMEL28 de melanoma humana

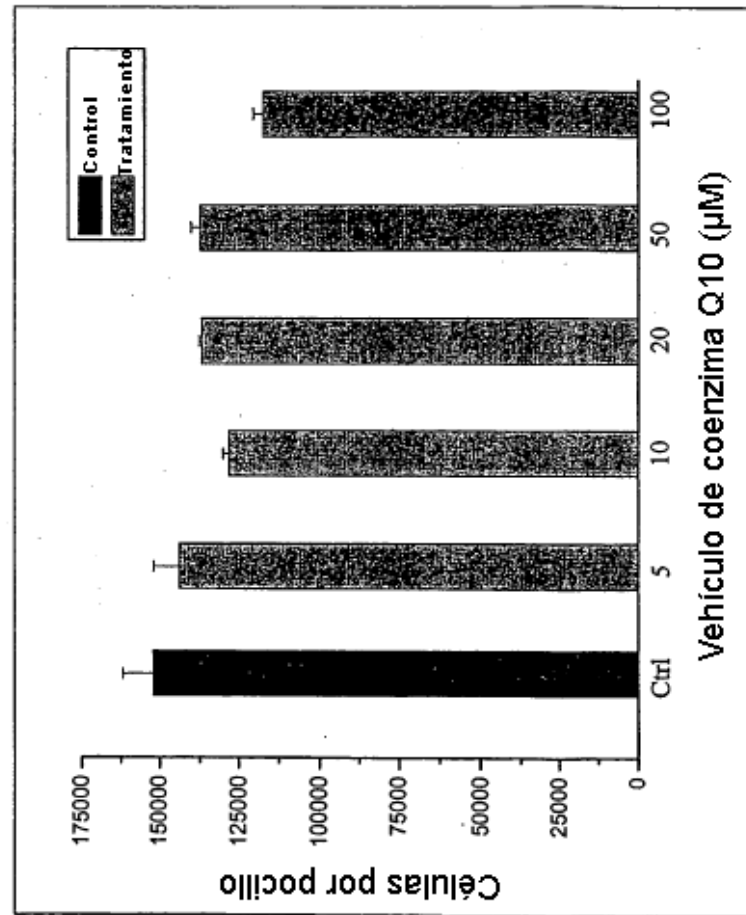


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P<0,05$

FIG. 3

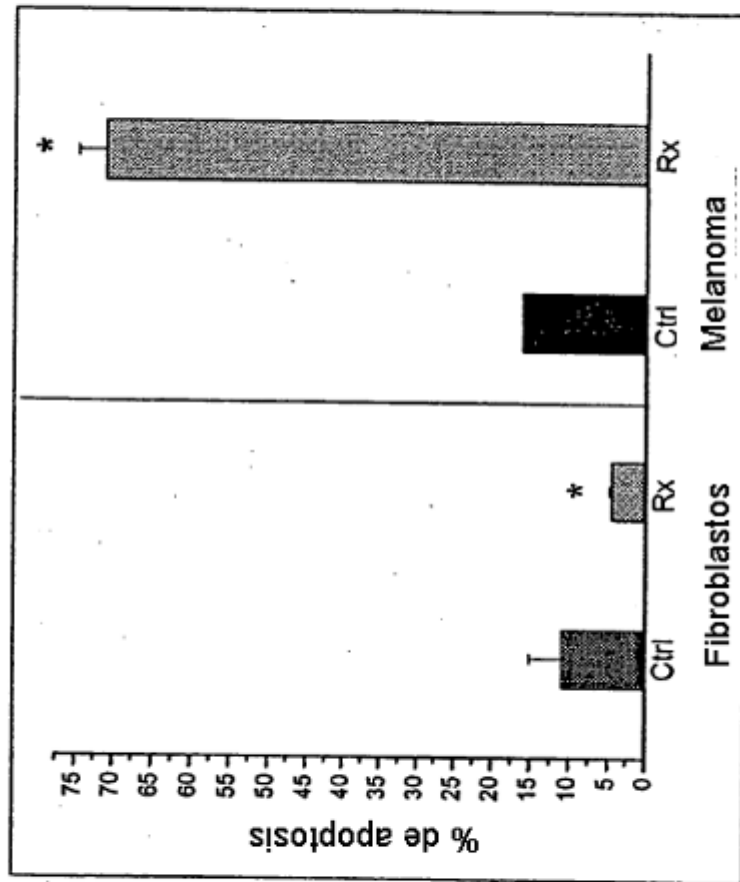
Efecto del vehículo de coenzima Q10 en la línea celular SKMEL28 de melanoma humana



Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$
FIG. 4

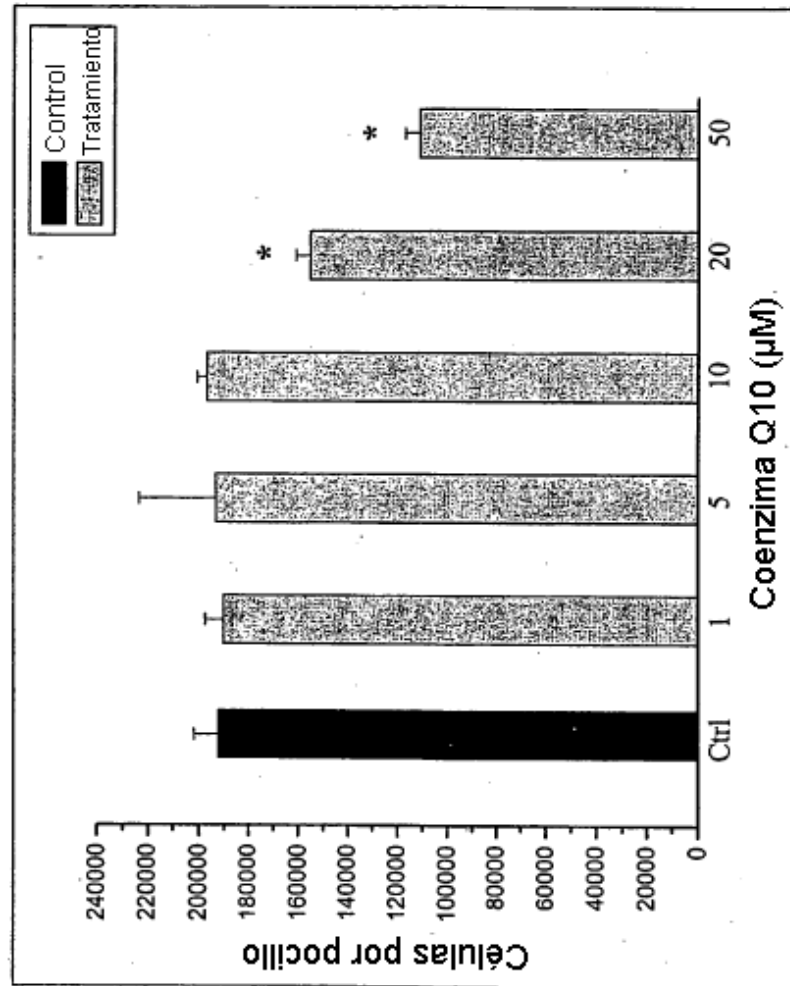
Efecto de la coenzima Q10 en la apoptosis en células de melanoma humano y fibroblastos - Ensayo de anexina PE



* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 5

Efecto de la coenzima Q10 en células de carcinoma escamoso

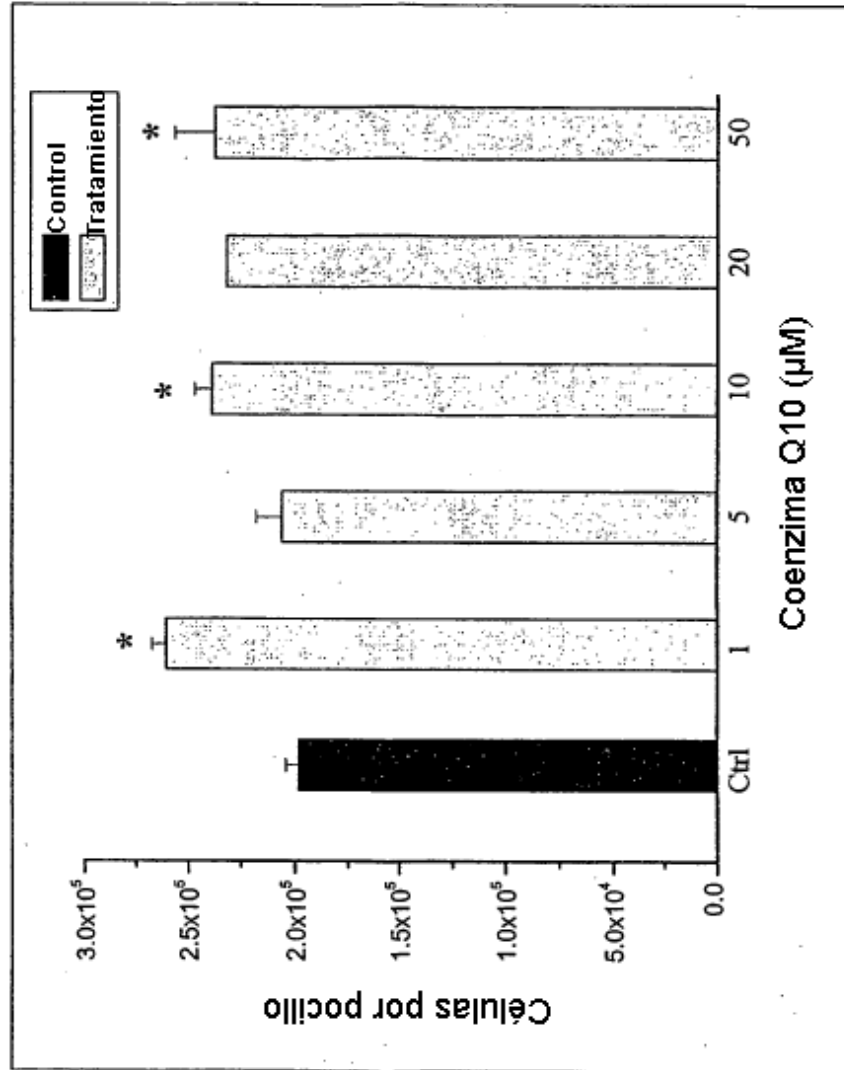


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 6

Efecto de la coenzima Q10 en fibroblastos neonatales humanos

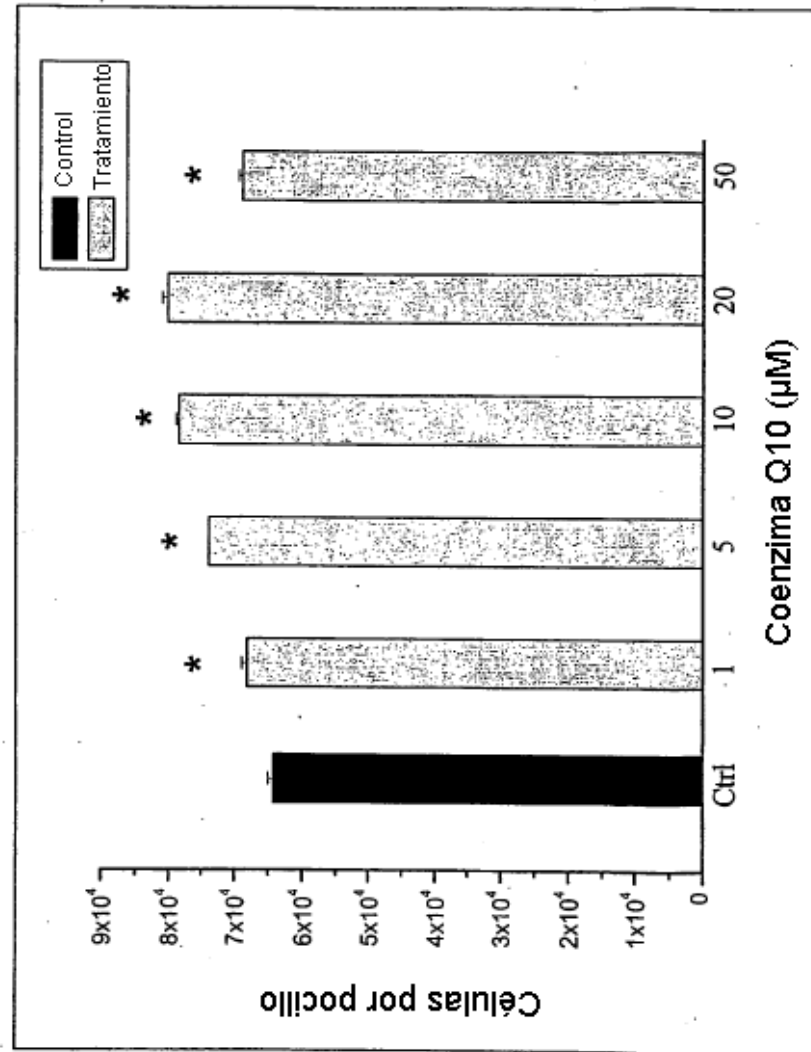


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 7

Efecto de la coenzima Q10 en queratinocitos neonatales humanos

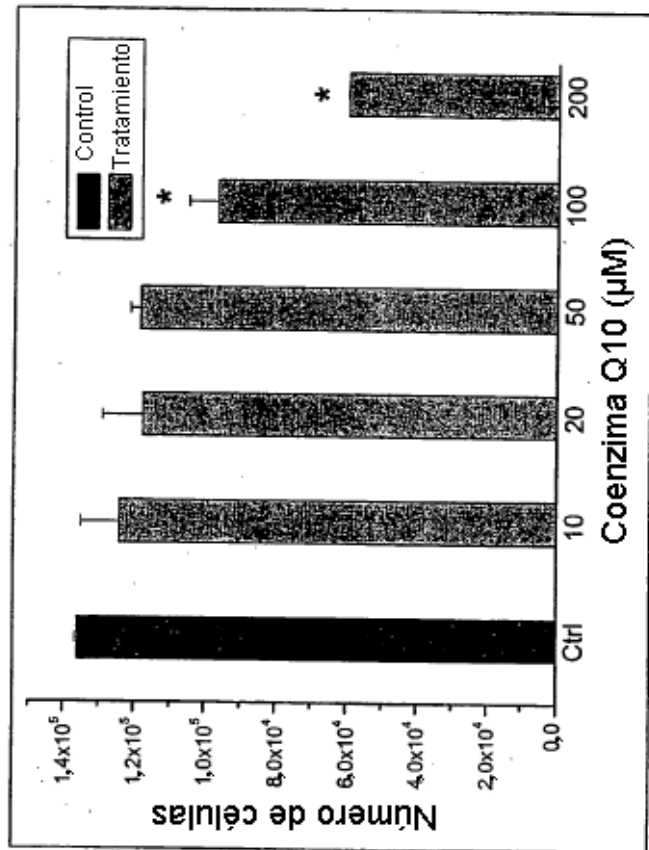


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P<0,05$

FIG. 8

**Efecto de Rx. Efecto de la CoQ10 en la línea celular
MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano**

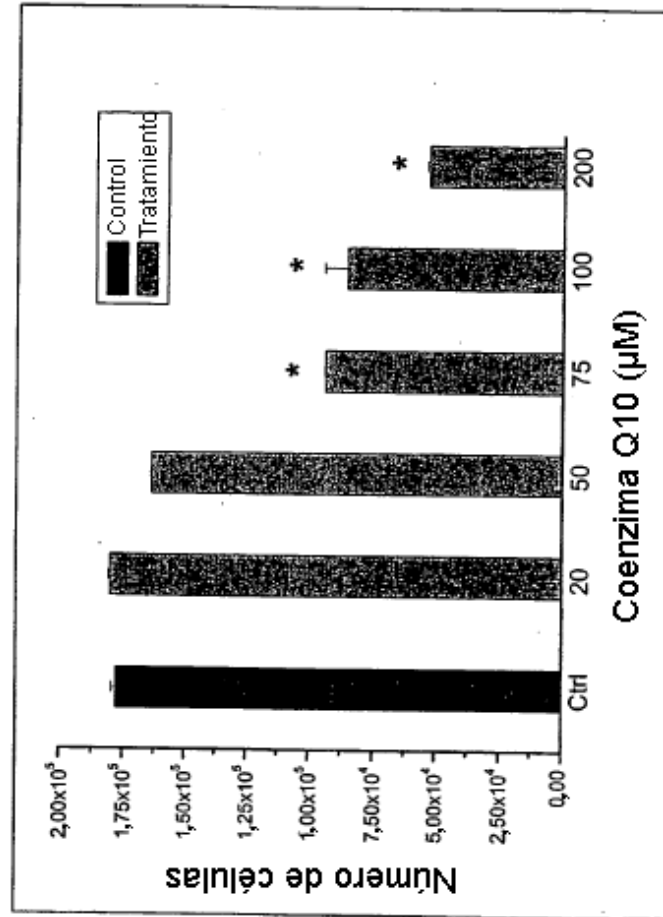


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 9

Efecto de Rx. Efecto de la CoQ10 en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano



Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P<0,05$

FIG. 10



Aspecto de tumores en ratón con tratamiento
frente a ratón control

FIG. 11

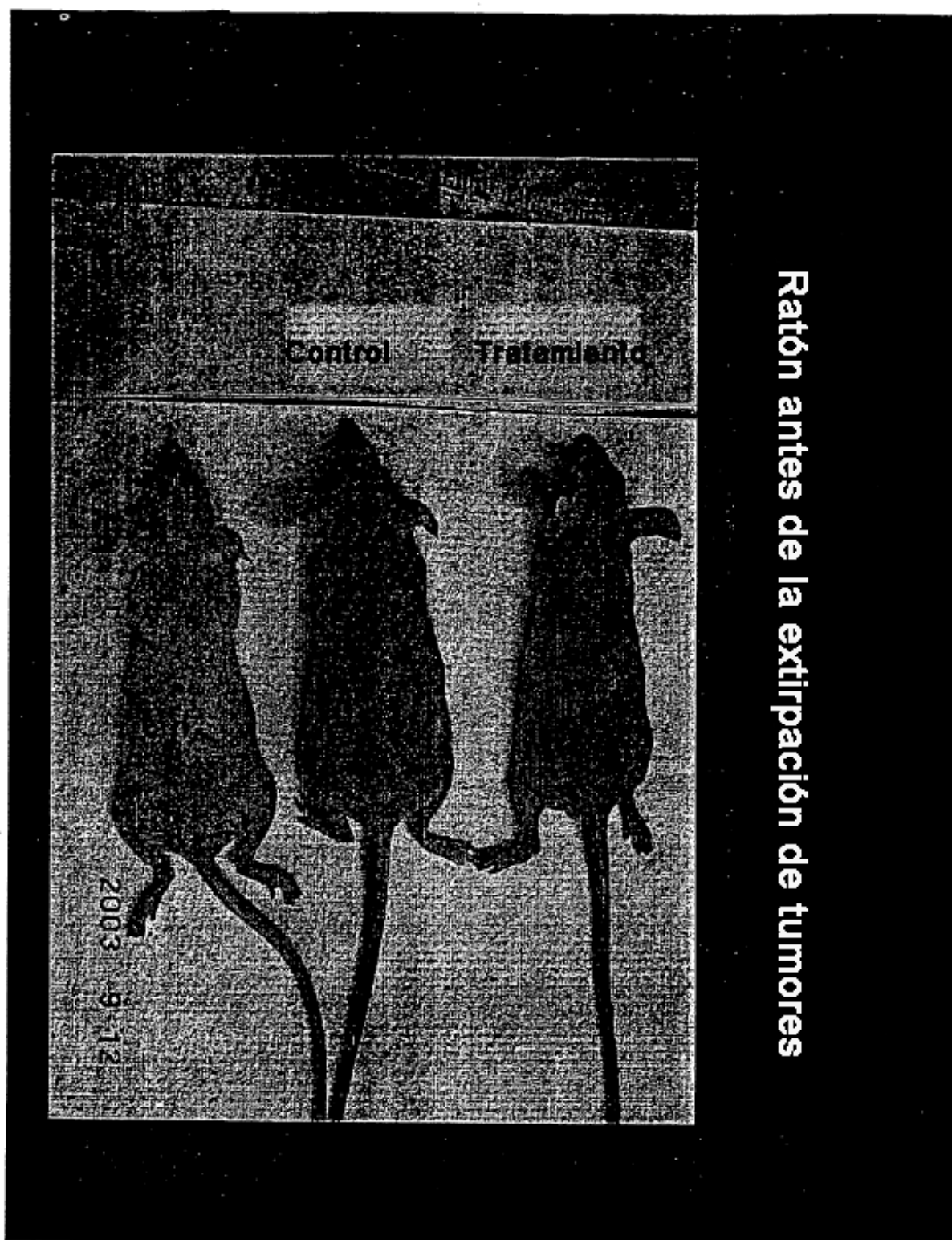


FIG. 12

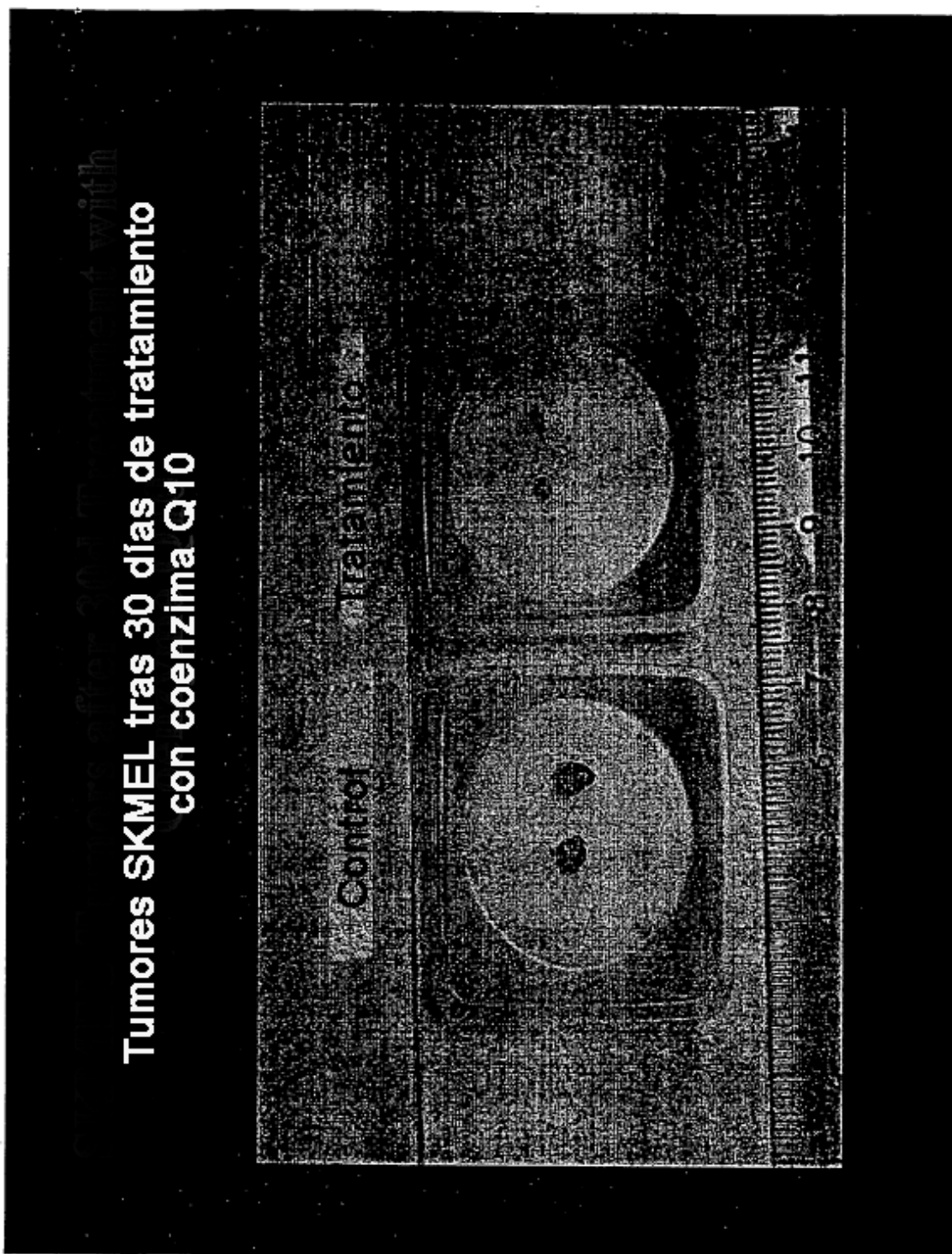
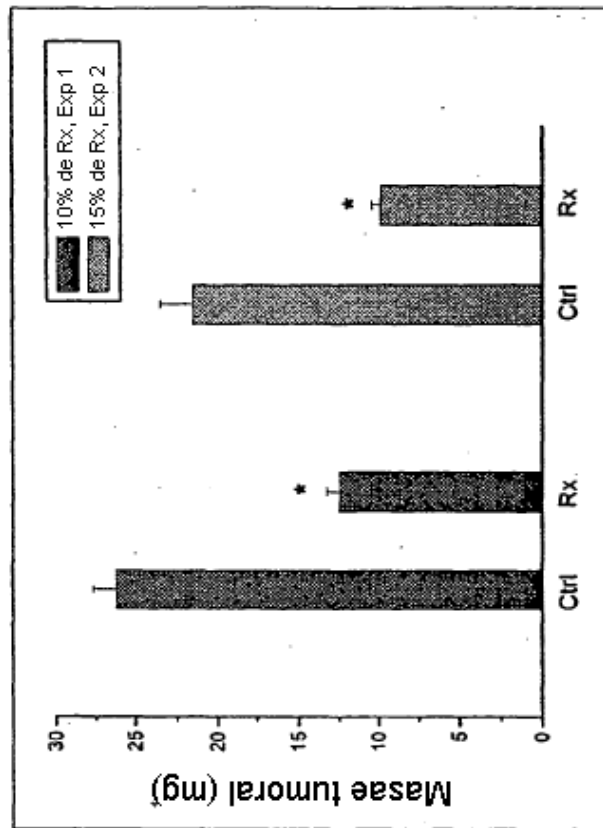


FIG. 13

Efecto de CoQ10 tópica en masa de tumor SKMEL28 en ratones atímicos



* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 14

Estudio *in vitro* de línea celular SK-BR-3 de adenocarcinoma
de mama humano incubada en medio complementado
con coenzima Q10 durante un periodo de 72 horas



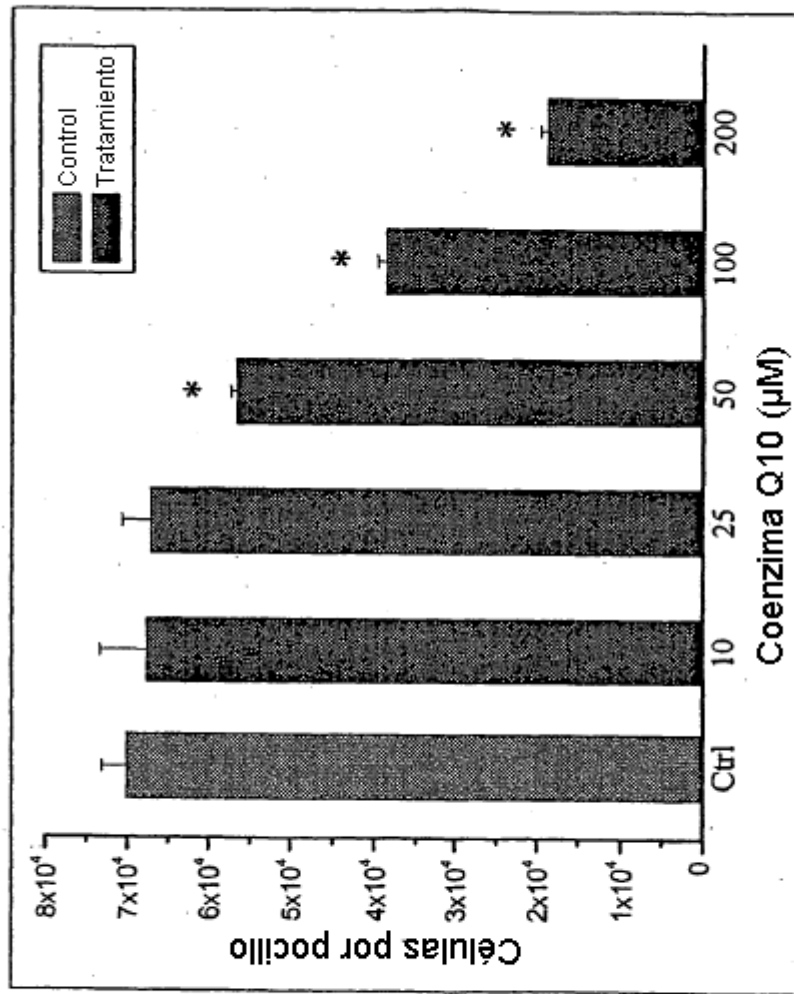
Control, CoQ10 0 μ M

CoQ10 100 μ M

CoQ10 200 μ M

FIG. 15

**Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular
SK-BR-3 de cáncer de mama**

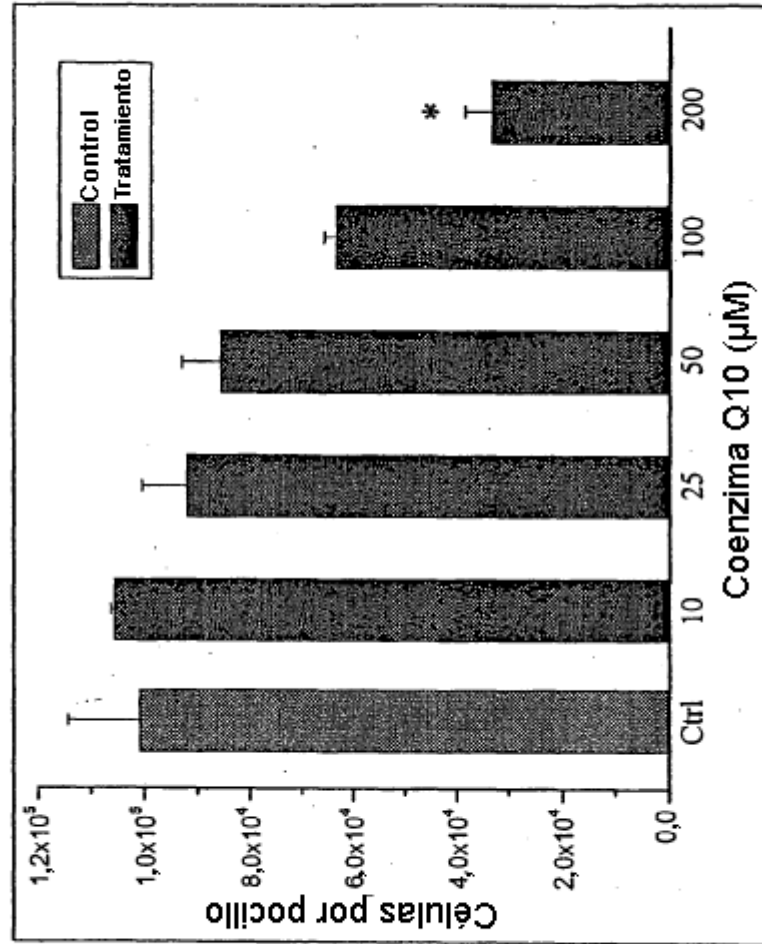


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 16

**Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular
SK-BR-3 de cáncer de mama**

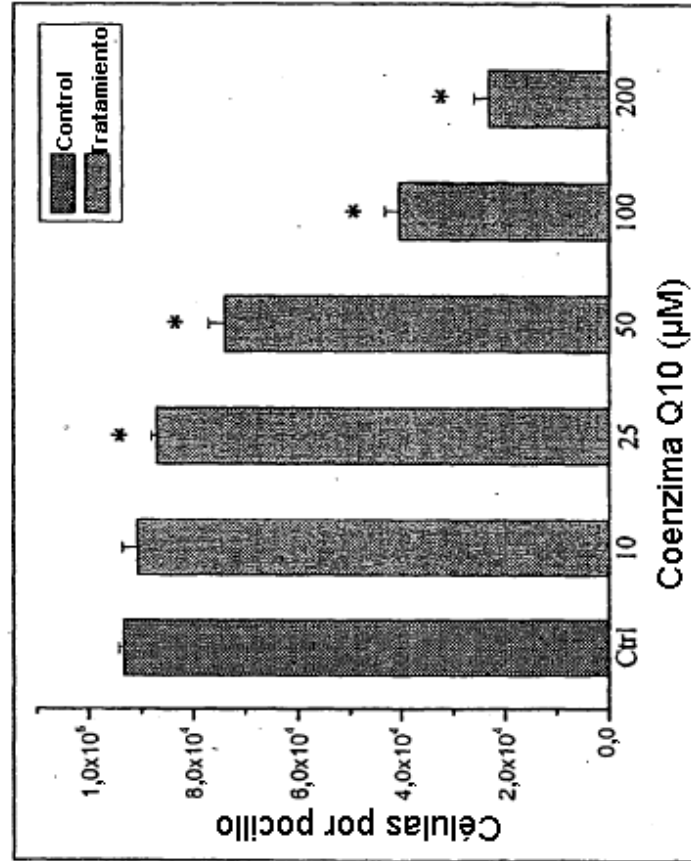


Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 17

**Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular
MDA-MB-468 de cáncer de mama**

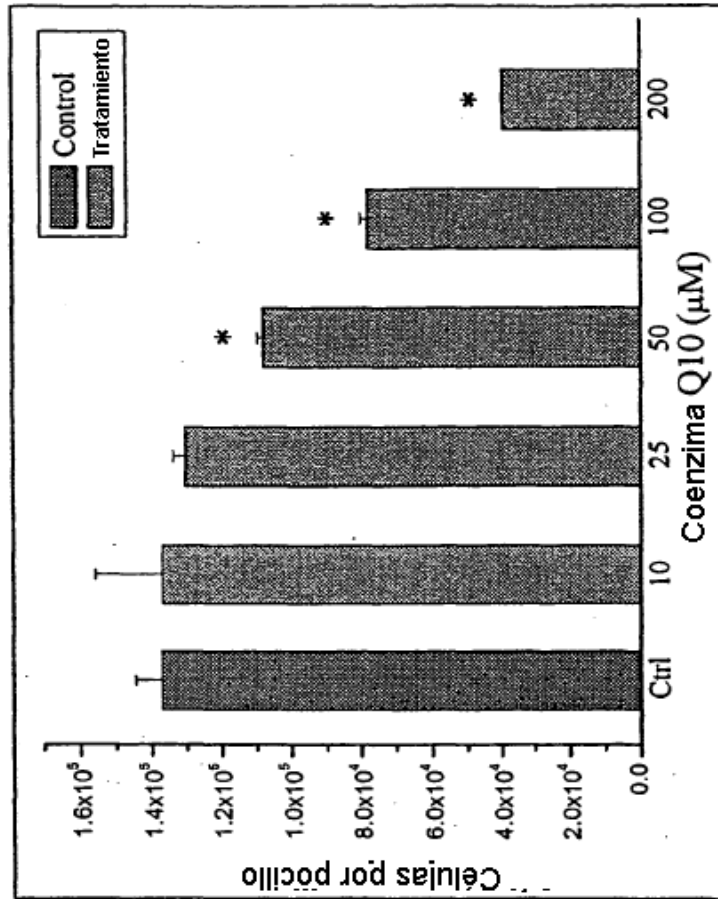


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 18

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular MDA-MB-468 de cáncer de mama

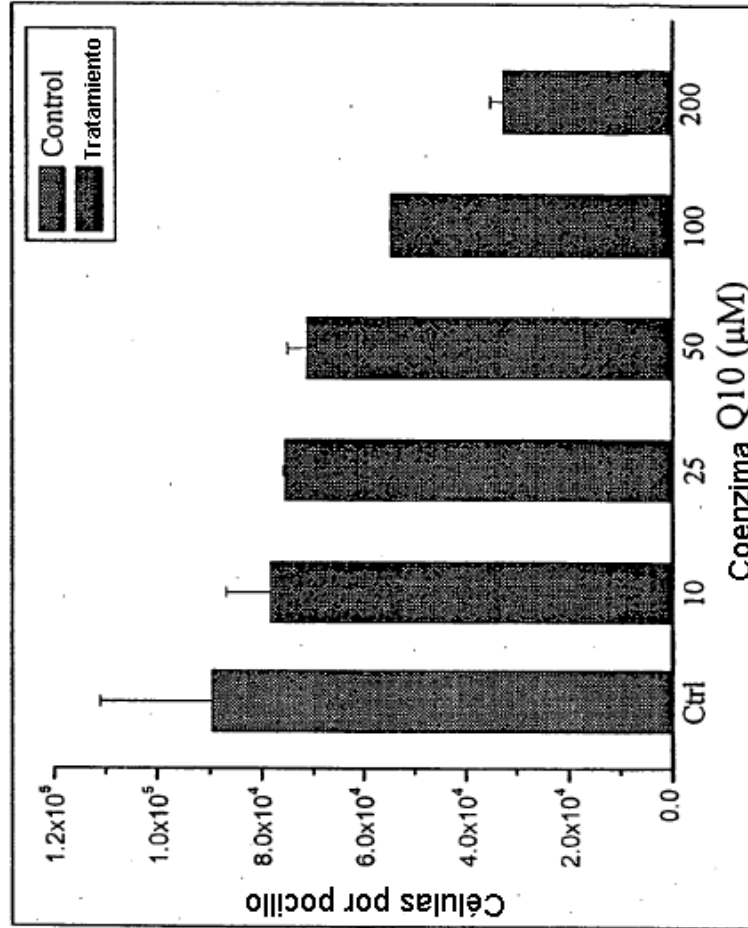


Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 19

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular BT-20 de cáncer de mama

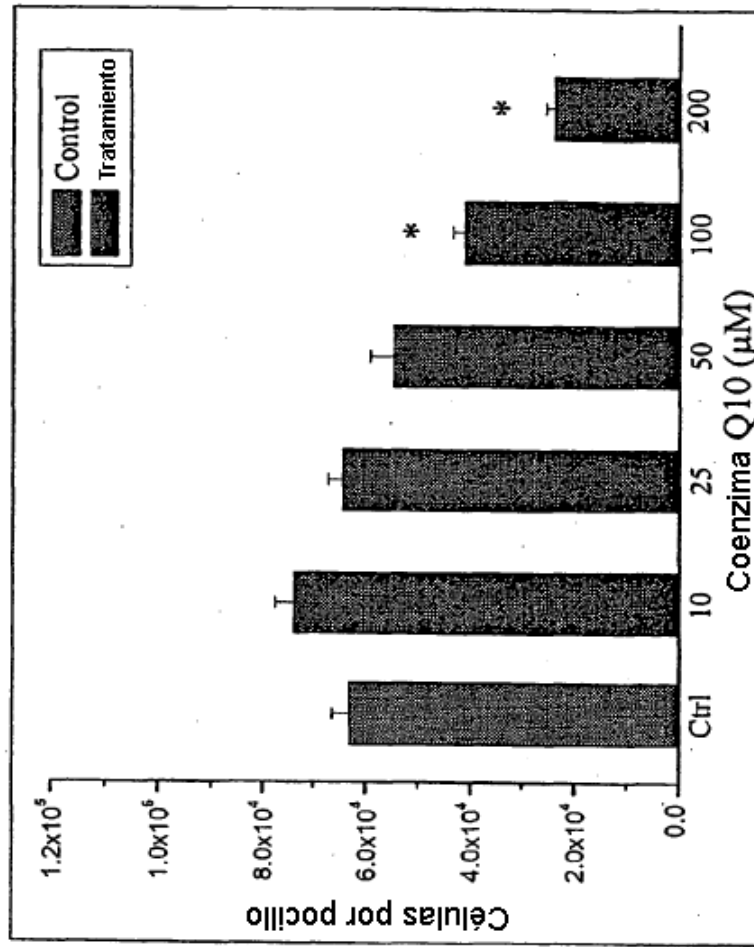


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P<0,05$

FIG. 20

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular BT-20 de cáncer de mama

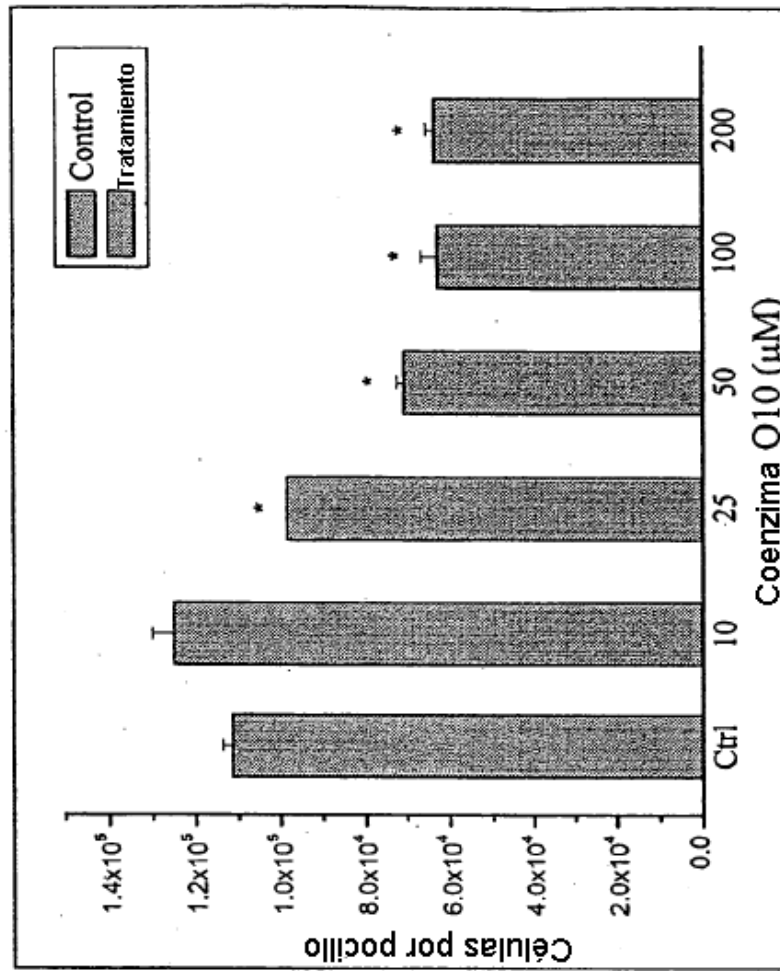


Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 21

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular Hep 38 de cáncer de hígado

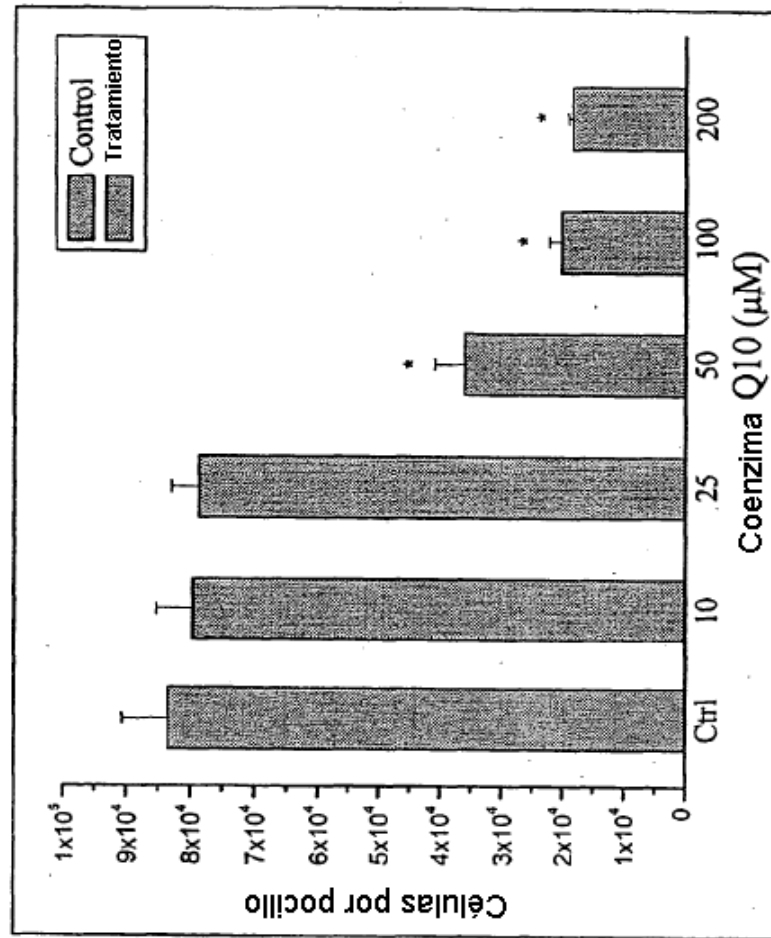


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control **P<0,05**

FIG. 22

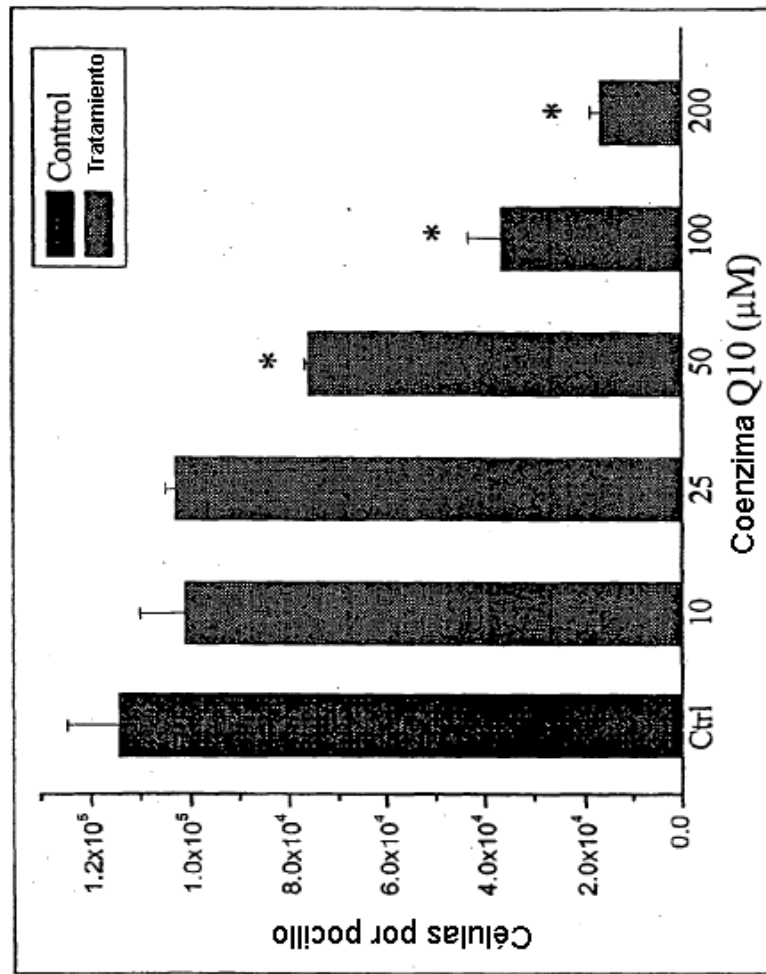
Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular HEP 3B de cáncer de hígado



Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P<0,05$ FIG. 23

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular 143B de osteosarcoma

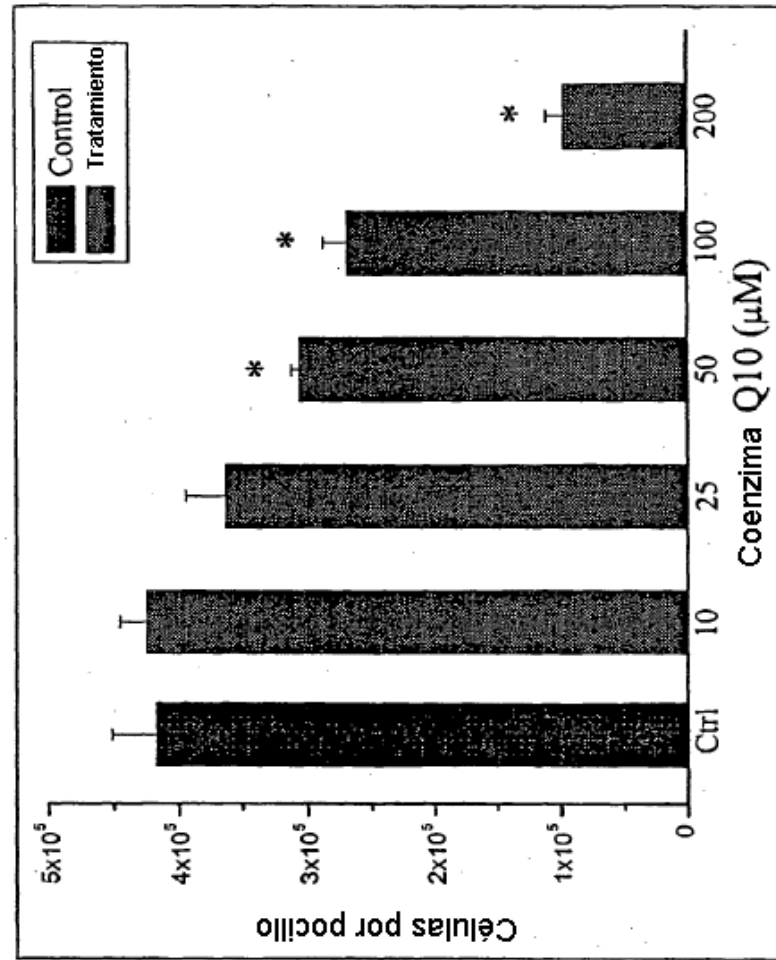


Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 24

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular 143B de osteosarcoma

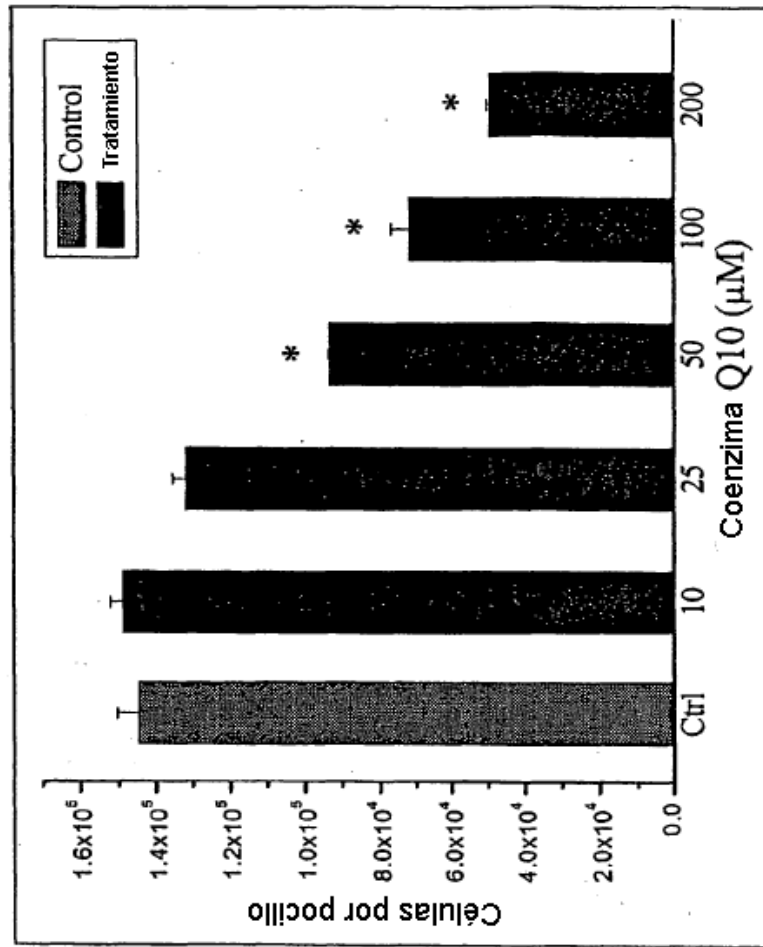


Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 25

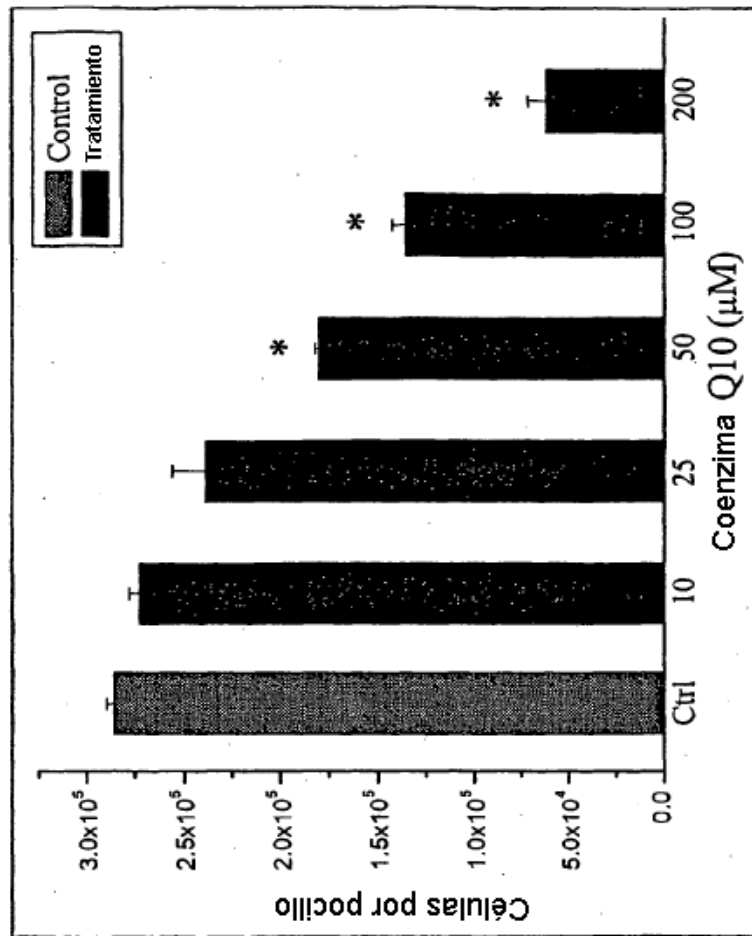
Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata



Tras 48 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$ FIG. 26

Efecto de la coenzima Q10 en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata

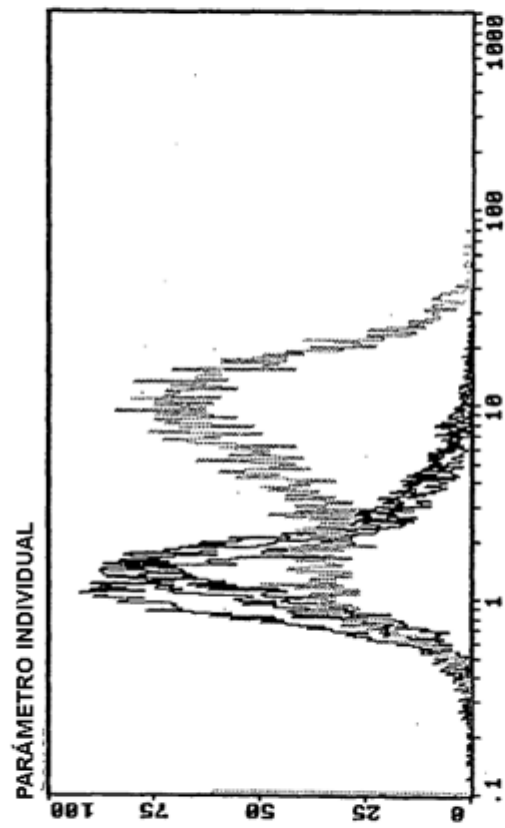


Tras 72 horas de incubación

* Significativo en comparación con control $P < 0,05$

FIG. 27

Q10 y permeabilidad mitocondrial en células PC-3: captación de JC-1



Registro de fluorescencia verde

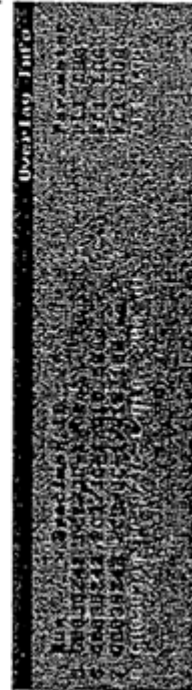


FIG. 28



FIG. 29A

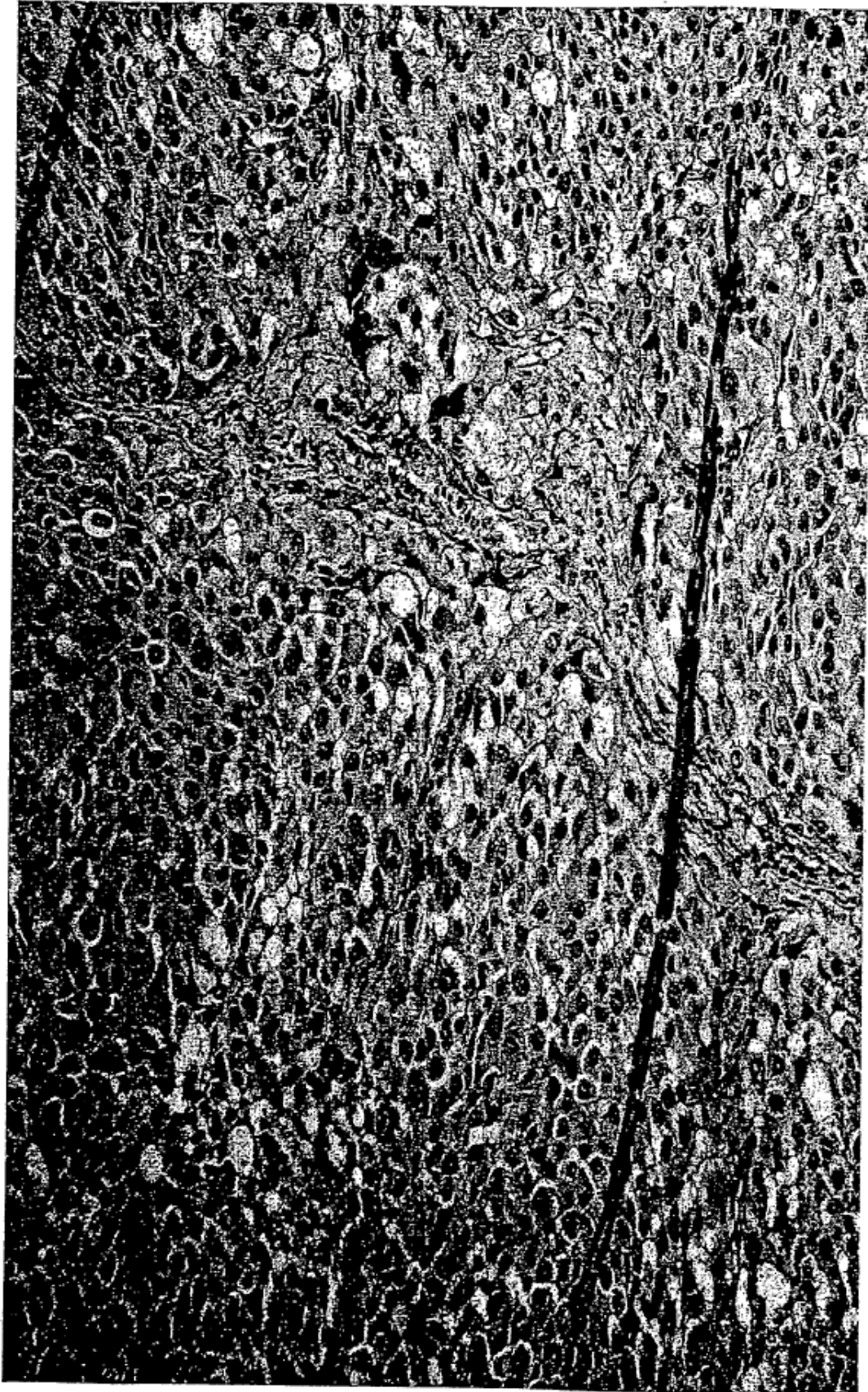


FIG. 29B