

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-049244- -00000-0000

Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA

UTILIZANDO UN CAMBIADOR EPIMETABOLICO (COENZIMA Q10)

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

CYTOTECH LABS, LLC

DOMICILIO _____

NASHVILLE, TENNESSEE, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-049244- -00000-0000
Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249
Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CYTOTECH LABS, LLC Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Dirección: 1845 Elm Pike, Nashville, Tennessee 37210, Estados Unidos de América Domicilio: Nashville, Tennessee, Estados Unidos de América		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 35.456.344 T.P. 23.555
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Rangaprasad SARANGARAJAN 21 Winifreds Way, Rutland, Massachusetts 01543, Estados Unidos de América 2. Niven Rajin NARAIN 350 Third Street, Suite 2005, Cambridge, Massachusetts 02142, Estados Unidos de América 3. John Patrick MCCOOK 4913 Southern Hills Drive, Frisco, Texas 75034, Estados Unidos de América		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2010/046711</u> Fecha: <u>25 de agsoto de 2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2011/031503 A3</u> Fecha: <u>17 de marzo de 2011</u>			
6 Título (54) <u>MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA UTILIZANDO UN CAMBIADOR EPIMETABÓLICO (COENZIMA Q10)</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 031/122</u>			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>US</u>	<u>25 de agosto de 2009</u>	<u>61/236,845</u>

9	Comprobante de pago No.: <u>12-0027339</u>	Fecha: <u>20 de marzo de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0027366</u>	Fecha: <u>20 de marzo de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0024919</u>	Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0024868</u>	Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u>
	Comprobante de pago No.: <u>12-0024869</u>	Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u>

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 44 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.320.000.oo.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poder de **CYTOTECH LABS, LLC**

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☐

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/031503 A3.

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☒

Arte final 12x12

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

1/11

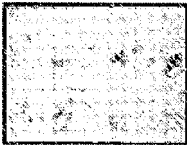


Fig. 1A



Fig. 1B

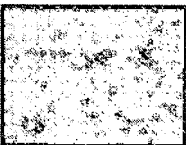


Fig. 1C

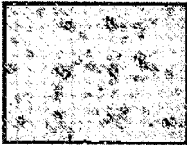


Fig. 1D

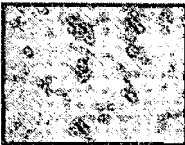


Fig. 1E

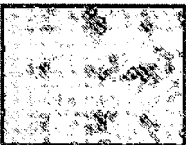


Fig. 1F



Fig. 1G

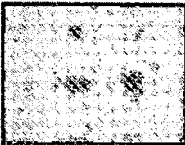


Fig. 1H

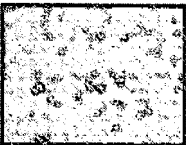


Fig. 1I



Fig. 1J

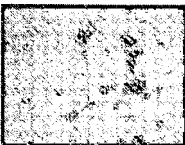


Fig. 1K



Fig. 1L

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luiz Clemencia De Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/031503 A3

Descripción:

Páginas 181 en español

Reivindicaciones: Número (s) 54

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 3

DE LA ESCRITURA NUMERO: 6112
FECHA: 18/Noviembre/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: - - - 6112 - - -

- - - SEIS MIL CIENTO DOCE - - -

FECHA: DIECIOCHO (18) DE NOVIEMBRE - - -

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2010) - - -

NOTARIA SEXTA (6ª) DEL CIRCULO NOTARIAL

DE BOGOTA D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS

NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO

- - - - - Notario Sexto (6º) - - - - - de éste

Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: - - - - -

CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL NOTARIO : - - - - -

COMPARECIO : Con minuta (e-mail) la señora ADRIANA ZAPATA GIRALDO, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: -----

ESTIPULACIONES:

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. **SEGUNDA:** Que **CYTOTECH LABS, LLC**, sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada en 1845 ~~ML~~ Hill Pike ~~Nashville~~ TN 37210, Estados Unidos de América, designó a CAVELIER ABOGADOS como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. **TERCERA.-** Que en su carácter de representante legal de CAVELIER ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por CYTOTECH LABS, LLC, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de



ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: **a)** Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; **b)** Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. **CUARTO.-** Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. **QUINTO.-** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación

7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO. 71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

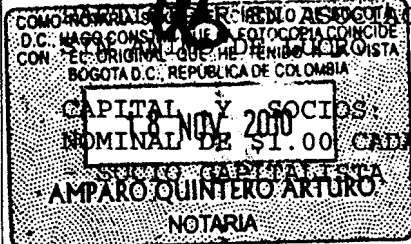
E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006 BOGOTA	D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006 BOGOTA	D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006 BOGOTA	D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006 BOGOTA	D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006 BOGOTA	D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006 BOGOTA	D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006 BOGOTA	D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006 BOGOTA	D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006 BOGOTA	D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006 BOGOTA	D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006 BOGOTA	D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006 BOGOTA	D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006 BOGOTA	D.C.	2010/03/24	00012506

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

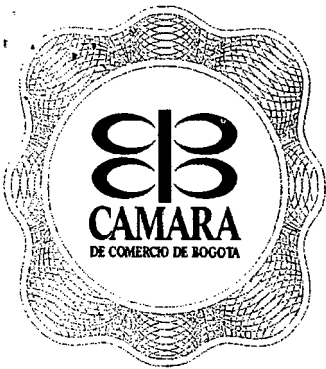
CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO ACCIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES



CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI : S)



01



* 9 8 4 4 7 4 4 4 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

3 DE NOVIEMBRE DE 2010

HORA 15:16:16

R029766299

PAGINA: 2 de 3

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

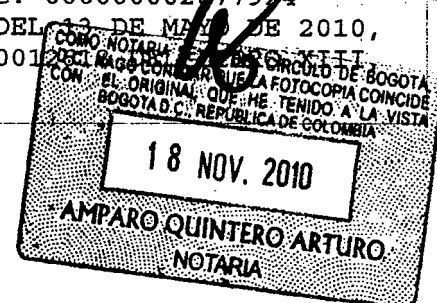
QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO
CAVELIER GAVIRIA GERMAN

IDENTIFICACION

C.C. 000000002977924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 12 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):



FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

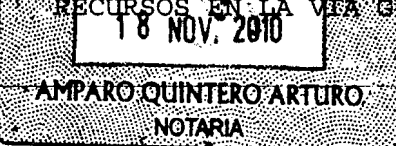
** REVISOR FISCAL **

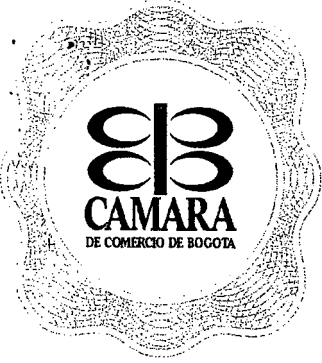
QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

COMO NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LAS COPIAS AUTENTICADAS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VITA GUBERNATIVA.





01



* 9 8 4 4 7 4 4 5 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

3 DE NOVIEMBRE DE 2010

HORA 15:16:16

R029766299

PAGINA: 3 de 3

* * * * *

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

* * *
* * *

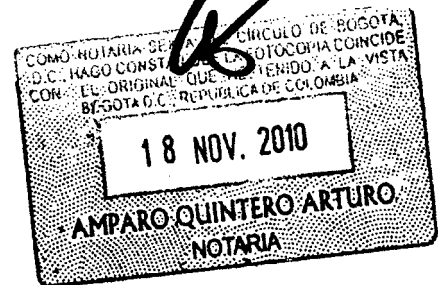
SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q



X

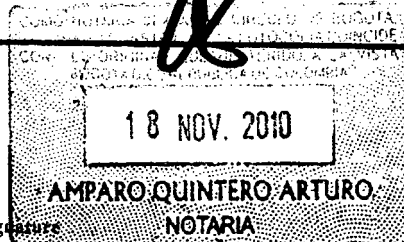
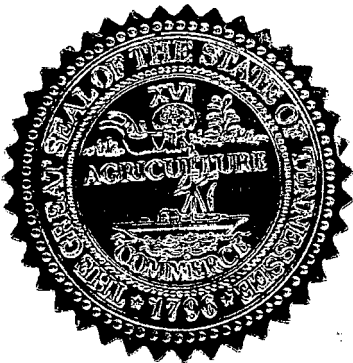
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by BILL KEMP
3. acting in the capacity of COUNTY CLERK OF SUMNER COUNTY, TENNESSEE
4. bears the seal/stamp of COUNTY SEAL OF SUMNER COUNTY, TENNESSEE

Certified

5. at Nashville, Tennessee
6. the Wednesday, October 27, 2010
7. by TRE HARGETT, SECRETARY OF STATE, STATE OF TENNESSEE
8. No. 10-10425

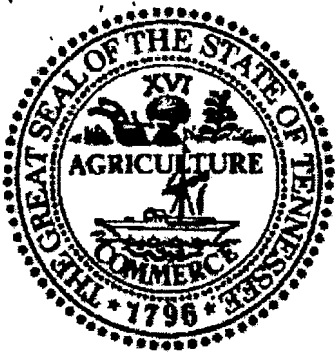


10.

Signature

Tre Hargett
ASW





BILL KEMP
SUMNER County Clerk

Notary Public Authentication

I, BILL KEMP, County Clerk of the County of SUMNER, Tennessee do hereby certify that RHONDA M POTTS was duly elected and commissioned a Notary Public At Large for the State of Tennessee on 01/29/2009, and is recorded in Book 2008 Page 488 in this office. The above-mentioned notary public at large commission does not expire until 1/29/2013.

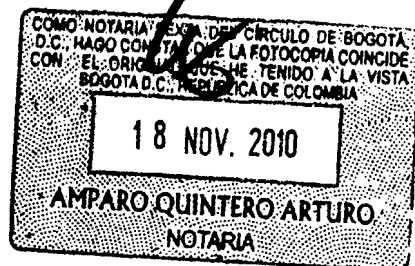
I further certify that to the best of my knowledge, information and believe, the signature affixed to the attached document is the true and genuine signature of RHONDA M POTTS, Notary Public At Large for the State of Tennessee.

In Witness Whereof, I have here to affixed my Signature and the seal of the County of SUMNER this day.

Bill Kemp
SUMNER County Clerk

Alexander R. Leland
Deputy Clerk

October 27, 2010
Date



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/ I (we), the undersigned

CYTOTECH LABS, LLC

domiciliado (s) Tennessee, EEUU
en/ of

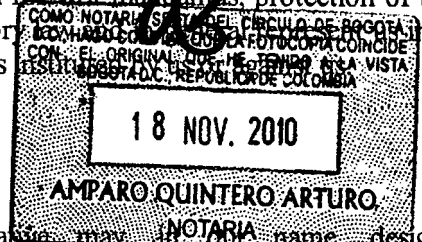
Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory actions and suits in any



The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervenier ad excludendum. Under this authorization,

© CAVELIER ABOGADOS

autorización; la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

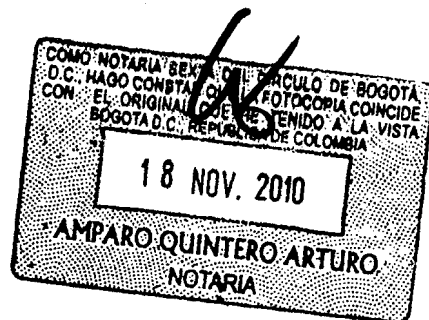
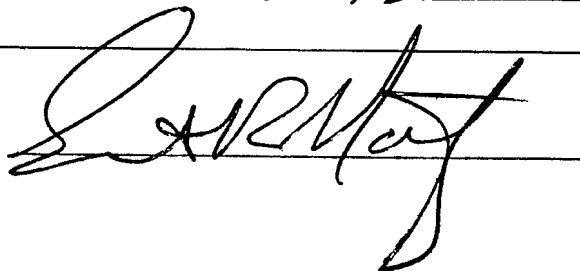
the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/ Given and signed this October 22, 2010

En/ in Nashville, Tennessee USA

Por/ by Ernest R. Martinez, Secretary

Firma/ Signature



Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/ she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

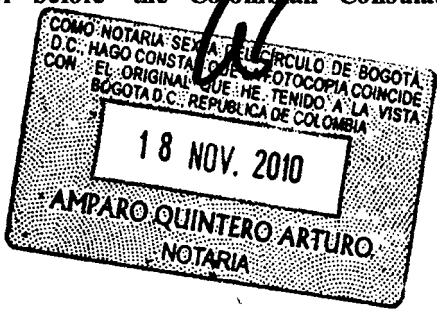
In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/ she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____
de la compañía _____.

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de _____

que la dirección de dicha compañía es _____

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en _____

El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

Ernest R. Martinez
is authentic, that the signatory currently acts in the position of Secretary
of the company Cytotech Labs LLC

a company currently existing and organized under the laws of Delaware

that the address is 1845 Elm Hill Pike
Nashville, TN 37210

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

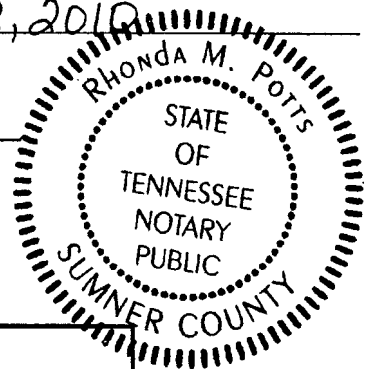
Given and signed in Nashville, TN

On October 22, 2010

Rhonda M. Potts

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

My Commission Expires on
January 29, 2013



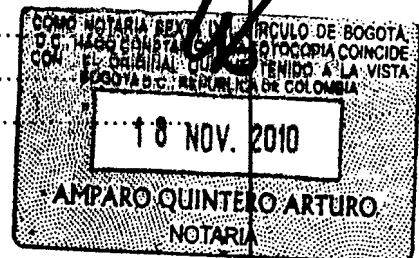
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: _____
2. This public document has been signed by _____
3. acting in the capacity of _____
4. bears the seal/stamp of _____

Certified

5. at _____
6. the _____
7. by _____
8. No. _____
9. Seal/stamp _____
10. Signature _____



17
Secretary of State
Division of Business Services
312 Rosa L. Parks Avenue
6th Floor, William R. Snodgrass Tower
Nashville, Tennessee 37243

DATE: 04/22/09
REQUEST NUMBER: 6525-0706
TELEPHONE CONTACT: (615) 741-2286
FILE DATE/TIME: 04/22/09 1425
EFFECTIVE DATE/TIME: 04/22/09 1425
CONTROL NUMBER: 0600968

TO:
CYTOTECH LABS, LLC
1845 ELM HILL PIKE

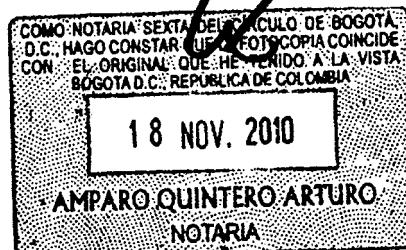
NASHVILLE, TN 37210

RE:
CYTOTECH LABS, LLC
APPLICATION FOR CERTIFICATE OF AUTHORITY -
LIMITED LIABILITY COMPANY

WELCOME TO THE STATE OF TENNESSEE. THE ATTACHED LIMITED LIABILITY COMPANY
CERTIFICATE OF AUTHORITY HAS BEEN FILED WITH AN EFFECTIVE DATE AS INDICATED
ABOVE.

A LIMITED LIABILITY COMPANY ANNUAL REPORT MUST BE FILED WITH THE SECRETARY OF
STATE ON OR BEFORE THE FIRST DAY OF THE FOURTH MONTH FOLLOWING THE CLOSE OF THE
LIMITED LIABILITY COMPANY'S FISCAL YEAR. ONCE THE FISCAL YEAR HAS BEEN
ESTABLISHED, PLEASE PROVIDE THIS OFFICE WITH WRITTEN NOTIFICATION. THIS OFFICE
WILL MAIL THE REPORT DURING THE LAST MONTH OF SAID FISCAL YEAR TO THE LIMITED
LIABILITY COMPANY AT THE ADDRESS OF ITS PRINCIPAL OFFICE OR TO A MAILING
ADDRESS PROVIDED TO THIS OFFICE IN WRITING. FAILURE TO FILE THIS REPORT OR TO
MAINTAIN A REGISTERED AGENT AND OFFICE WILL SUBJECT THE LIMITED LIABILITY
COMPANY TO ADMINISTRATIVE REVOCATION OF ITS CERTIFICATE OF AUTHORITY.

WHEN CORRESPONDING WITH THIS OFFICE OR SUBMITTING DOCUMENTS FOR FILING, PLEASE
REFER TO THE LIMITED LIABILITY COMPANY CONTROL NUMBER GIVEN ABOVE.



FOR: APPLICATION FOR CERTIFICATE OF AUTHORITY -
LIMITED LIABILITY COMPANY

ON DATE: 04/22/09

FROM:
CYTOTECH LABS, LLC
7672 AVIANCA DRIVE
SUITE C-50
REDDING, GA 96002-9713

FEE
RECEIVED: \$1,800.00 \$0.00

TOTAL PAYMENT RECEIVED: \$1,800.00

RECEIPT NUMBER: 00004577107
ACCOUNT NUMBER: 00629220



SS-4458

Tre Hargett
TRE HARGETT
SECRETARY OF STATE



FILED

State of Tennessee



Department of State
Corporate Filings
312 Rosa L. Parks Avenue
6th Floor, William R. Snodgrass Tower
Nashville, TN 37243

APPLICATION FOR
CERTIFICATE OF AUTHORITY
(Limited Liability Company)

For Office Use Only

2009 APR 22 PM 2:35

SECRETARY OF STATE

To the Secretary of State of the State of Tennessee:

Pursuant to the provisions of §48-249-904 of the Tennessee Revised Limited Liability Company Act, the undersigned hereby applies for a certificate of authority to transact business in the State of Tennessee, and for that purpose sets forth:

1. The name of the Limited Liability Company is: CYTOTECH LABS, LLC

If different, the name under which the certificate of authority is to be obtained is: _____

NOTE: The Secretary of State of the State of Tennessee may not issue a certificate of authority to a foreign Limited Liability Company if its name does not comply with the requirements of § 48-249-106 of the Tennessee Revised Limited Liability Company Act. If obtaining a certificate of authority under an assumed Limited Liability Company name, an application must be filed pursuant to § 48-249-106(d).

2. The state or country under whose law it is formed is: DELAWARE

and its date of its formation is: OCTOBER 26, 2006 (must be month, day and year)

3. The complete street address (including zip code) of its principal executive office is:

1845 ELM HILL PIKE NASHVILLE TN 37210
Street City/State Zip Code

4. The complete street address (including the county and the zip code) of its registered office in Tennessee:

1845 ELM HILL PIKE NASHVILLE TN DAVIDSON 37210
Street City/State County Zip Code

The name of its registered agent at that office is: ERNEST R. MARTINEZ, ESQ.

5. If the provisions of TCA §48-249-309(i) (relating to foreign series LLCs) apply, the certificate of authority should be attached as part of this document.

6. The number of members at the date of filing if more than six (6): _____

7. If the limited liability company commenced doing business in Tennessee prior to the date of commencement (month, day and year) JANUARY 1, 2008. NOTE: Additional filing fees may apply. See section 48-249-913(d).

NOTE: This application must be accompanied by a certificate of existence or a document of similar import (for example, a certificate of good standing) duly authenticated by the Secretary of State or other official having custody of the Limited Liability Company records in the state or country under whose law it is organized. The certificate shall not bear a date of more than two (2) months prior to the date the application is filed in this state.

Signature Date

4/21/09
GENERAL COUNSEL

Signer's Capacity

CYTOTECH LABS, LLC

Name of Limited Liability Company

Signature

ERNEST R. MARTINEZ

Name (typed or printed)



STATE OF TENNESSEE
Tre Hargett, Secretary of State
Division of Business Services
312 Rosa L. Parks Avenue
6th Floor, William R. Snodgrass Tower
Nashville, TN 37243

Filing Information

Name: **CYTOTECH LABS, LLC**

General Information

Control #: 600968
Filing Type: Limited Liability Company - Foreign
Filing Date: 04/22/2009 2:25 PM
Status: Active
Duration Term: Perpetual
Managed By: Manager Managed

Formation Locale: Delaware
Date Formed: 10/26/2006
Fiscal Year Close: 12
Member Count: 6

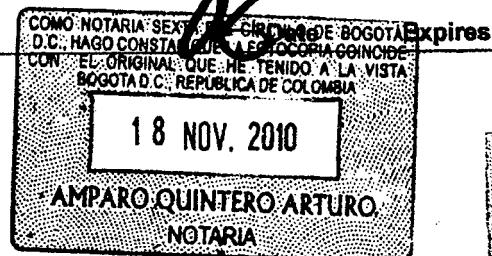
Registered Agent Address
ERNEST R MARTINEZ ESQ
1845 ELM HL PIKE
NASHVILLE, TN 37210 USA

Principal Address
1845 ELM HILL PIKE
NASHVILLE, TN 37210 USA
Phone: (615) 872-2775

The following document(s) was/were filed in this office on the date(s) indicated below:

Date Filed	Filing Description	Image #
02/23/2010	2009 Annual Report	6658-2210
	Member Count Changed From: 1 To: 6	
04/23/2009	2008 Annual Report	6525-1143
04/22/2009	Initial Filing	6525-0706

Active Assumed Names (if any)



Delaware

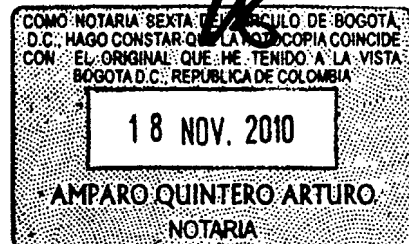
The First State

RECEIVED
STATE OF TENNESSEE
PAGE 1

2009 APR 22 PM 2:35

SECRETARY OF STATE

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "CYTOTECH LABS, LLC" IS DULY FORMED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE TWENTIETH DAY OF APRIL, A.D. 2009.



4242094 8300

090379773

You may verify this certificate online
at corp.delaware.gov/authver.shtml

Jeffrey W. Bullock, Secretary of State
AUTHENTICATION: 7255265

DATE: 04-20-09

19

TRADUCCIÓN OFICIAL NO.871/2010.-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES Y LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN OTORGADO POR CYTOTECH LABS, LLC., DOMICILIADA EN TENNESSEE, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, A CAVELIER ABOGADOS.

DADO Y FIRMADO EL 22 DE OCTUBRE DE 2010, EN NASHVILLE, TENNESSEE, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

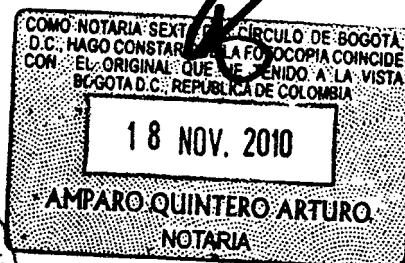
FIRMADO: ERNEST R. MARTINEZ, SECRETARIO

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

EL INFRASCRITO ABOGADO, NOTARIO CERTIFICA QUE LA FIRMA QUE ANTECEDE DE **ERNEST R. MARTINEZ** ES AUTÉNTICA; QUE EL SIGNATARIO DESEMPEÑA ACTUALMENTE EL CARGO DE **SECRETARIO**, DE LA SOCIEDAD **CYTOTECH LABS LLC.**, SOCIEDAD QUE ACTUALMENTE EXISTE Y ESTÁ ORGANIZADA DE ACUERDO A LAS LEYES DE DELAWARE, QUE LA DIRECCIÓN DE DICHA COMPAÑÍA ES 1845 EML HILL PIKE NASHVILLE, TN 37210 Y QUE EL SIGNATARIO TIENE FACULTAD PARA OTORGAR ESTE DOCUMENTO.

DADO Y FIRMADO: EN NASHVILLE, TN EL 22 DE OCTUBRE DE 2010

FIRMADO: RHONDA M. POTTS, NOTARIO PUBLICO, CONDADO DE SUMNER, ESTADO DE TENNESSEE, CON COMISIÓN HASTA EL 29 DE ENERO DE 2010. HAY SELLO DEL NOTARIO.



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: **BILL KEMP**
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: OFICIAL DEL CONDADO DE
SUMNER, TENNESSEE
4. LLEVA EL SELLO DE: CONDADO DE SUMNER, TENNESSEE

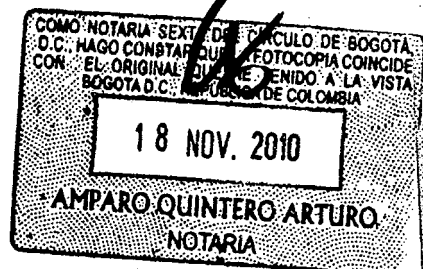
CERTIFICADO

5. EN: NASHVILLE, TENNESSEE
6. EL: MIÉRCOLES, 27 DE OCTUBRE DE 2010
7. POR: **TRE HARGETT**, SECRETARIO DE ESTADO DE TENNESSEE
8. BAJO EL NO.: **10-10425**
9. SELLO: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE TENNESSEE
10. FIRMADO: **TRE HARGETT**

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

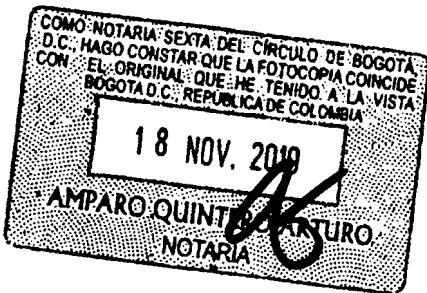
2019 NOV 12 A 4:59

JEFE DE ADMINISTRACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

62978

Helena de Cárbe
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



BILL KEMP

FUNCIONARIO DEL CONDADO DE SUMNER

AUTENTICACIÓN DE NOTARIO PÚBLICO

YO, BILL KEMP, OFICIAL DEL CONDADO DE SUMNER, Tennessee por medio del presente certifico que RHONDA M. POTTS, ha sido debidamente elegida y comisionada como NOTARIO PUBLICO del Estado de Tennessee el 29 de enero de 2009 y ha sido registrada en el Libro 2008, Página 488 en este despacho. Su comisión como notario público es válida hasta el 29 de enero de 2013.

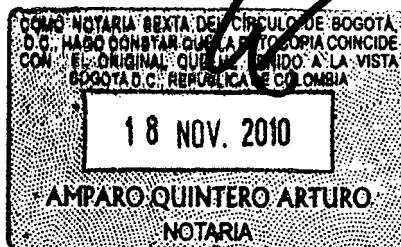
Certifico, además, que a mi leal saber y entender, la firma que ha sido consignada sobre el documento anexo es la firma fiel y verdadera de RHONDA M. POTTS, Notario Público para el Estado de Tennessee.

En testimonio de lo anterior firmo y pongo el sello del Condado de Sumner este día.

FIRMADO: BILL KEMP, OFICIAL DEL CONDADO DE SUMNER

FIRMADO: ILEGIBLE, OFICIAL DELEGADO.

FECHA: 27 DE OCTUBRE DE 2010



TRADUCCIÓN OFICIAL NO.871/2010.-

SECRETARIO DE ESTADO
DIVISION DE SERVICIOS COMERCIALES
312 ROSA L. PARKS AVENUE
6TH FLOOR, WILILIAM R. SNODGRASS TOWER
NASHVILLE, TENNESSEE 37243

FECHA: 04/22/09
SOLICITUD NO. 6525 0706
CONTACTO TELEFONICO: (615) 741 2286
FECHA Y HORA DE RADICACION 04/22/09 1425
FECHA Y HORA DE ENTRADA EN VIGOR: 04/22/09 1425
NUMERO DE CONTROL. 0600968

A:

CYTOTECH LABS,LLC
1845 ELM HILL PIKE

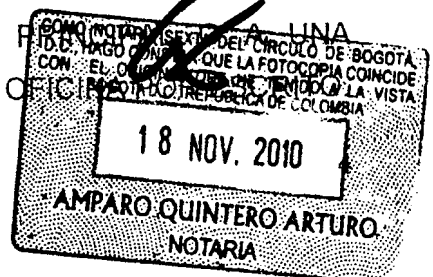
NASVILLE, TN 37210

REF: CYTOTECH LABS, LLC

SOLICITUD DE UN CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN COMPAÑÍA DE
RESPONSABILIDAD LIMITADA

BIENVENIDO AL ESTADO DE TENNESSEE. EL CERTIFICADO DE
AUTORIZACIÓN ADJUNTO DE UNA COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD
LIMITADA HA SIDO RADICADO CON UNA FECHA DE ENTRADA EN VIGOR,
TAL COMO SE INDICA ARRIBA.

SE DEBE RADICAR ANTE EL SECRETARIO DE ESTADO UN INFORME
ANUAL DE LA COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD LIMITADA EN O ANTES
DEL PRIMER DÍA DEL CUARTO MES DESPUÉS DEL CIERRE DEL AÑO
FISCAL. UNA VEZ EL AÑO FISCAL HAYA SIDO ESTABLECIDO, SÍRVASE
NOTIFICÁRSELO POR ESCRITO A ESTE DESPACHO. DURANTE EL
ÚLTIMO MES DE DICHO AÑO FISCAL, ESTE DESPACHO LE ENVIARÁ EL
INFORME POR CORREO A LA COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD
LIMITADA A LA DIRECCIÓN DE SU OFICINA. LA DIRECCIÓN DE CORREO SUMINISTRADA A ESTA OFICINA



TRADUCCIÓN OFICIAL NO.871/2010.-

EL INCUMPLIMIENTO EN PRESENTAR ESTE INFORME O EN MANTENER UN AGENTE REGISTRADO Y UNA OFICINA LE SIGNIFICARÁ A LA COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD LIMITADA LA REVOCACIÓN ADMINISTRATIVA DE SU CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN.

CUANDO ENVÍE CORRESPONDENCIA A ESTE DESPACHO O PRESENTE DOCUMENTOS PARA SU RADICACIÓN, SÍRVASE REFERIRSE AL NÚMERO DE CONTROL DE LA COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD LIMITADA QUE SE INDICÓ ARRIBA.

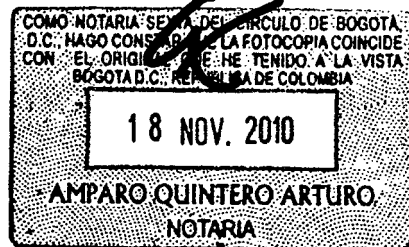
PARA: SOLICITUD DE CERTIFICADO DE AUTORIDAD FECHA: 04/22/09
COMPAÑÍA DE RESPONSABILIDAD LIMITADA

PARA:

CYTOTECH LABS, LLC
7672 AVIANCA DRIVE
SUITE C-50
REDDING, GA 96002-9713

RECIBIDO: DERECHOS \$1800.00
TOTAL PAGO RECIBIDO: \$1.800.00
NÚMERO DE RECIBO: 00004577107
NÚMERO DE CUENTA: 00629220

FIRMADO: THRE HARGETT,
SECRETARIO DE ESTADO
HAY EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE TENNESSEE



ESTADO DE TENNESSEE DEPARTAMENTO DE ESTADO RADICACIONES CORPORATIVAS 312 ROSA L. PARKS AVENUE 6TH FLOOR, WILILIAM R. SNODGRASS TOWER NASHVILLE, TENNESSEE 37243	RADICADO RECIBIDO ESTADO DE TENNESSEE 22 ABRIL, 2009 2:35P.M. SECRETARIO DE ESTADO DE TENNESSEE
--	--

SOLICITUD PARA CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN
(COMPAÑIA DE RESPONSABILIDAD LIMITADA)

Al Secretario de Estado del Estado de Tennessee:
De conformidad con las disposiciones de §48-249-904 de la Ley Revisada de Compañías de Responsabilidad Limitada de Tennessee, el suscrito por medio del presente solicita un Certificado de Autoridad para llevar a cabo actividades comerciales en el Estado de Tennessee y para tal fin declara:

1. El nombre de la Compañía de Responsabilidad Limitada es :

CYTOTECH LABS, LLC.

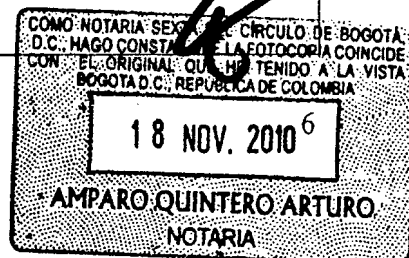
Si fuere diferente, el nombre bajo el cual el Certificado de autorización debe ser expedido es:

NOTA: El secretario del Estado de Tennessee puede no expedir el Certificado de autorización a una Compañía de Responsabilidad Limitada extranjera si el nombre no cumple con los requisitos de §48-249-106 de la Ley Revisada de Compañías de Responsabilidad Limitada de Tennessee. Si se desea obtener un Certificado de Autorización para una Compañía de Responsabilidad Limitada bajo un nombre inventado, dicha solicitud debe ser radicada de conformidad con de §48-249-106(d).

2. El Estado o el País bajo cuya ley se ha formado es DELAWARE y su fecha de formación es 26 de octubre de 2006 (mes, día y año)

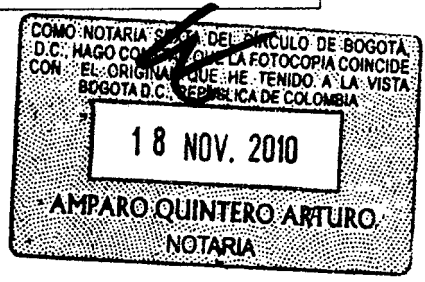
3. La dirección completa incluyendo el código postal de la oficina ejecutiva principal es :

1845 ELM HILL PIKE -- CIUDAD/ESTADO: NASHVILLE TN -- CÓDIGO ZIP 37210



TRADUCCIÓN OFICIAL NO.871/2010.-

4. La dirección completa (incluyendo el país y el código postal) de la oficina registrada en Tennessee es: 1845 ELM HILL PIKE -- CIUDAD/ESTADO: NASHVILLE TN -- CONDADO: DAVIDSON -- CÓDIGO ZIP. 37210 El nombre del agente registrado en dicha oficina es: ERNEST R. MARTINEZ, ESQ.	
5. Si aplican las disposiciones de TCA §48-249-309(i) (relativas a series extranjeras LLC), entonces se debe anexar como parte de este documento la información requerida por dicha sección.	
6. El número de miembros en la fecha de radicación si son más de seis (6)	
7. Si la compañía de responsabilidad limitada inició labores comerciales en Tennessee antes de la aprobación de ésta solicitud, la fecha de inicio (mes, día y año) 1° de Enero de 2008. Nota: Puede haber derechos de radicación adicionales. Ver sección 48.249-913(d).	
NOTA: Esta Solicitud debe ir acompañada por un certificado de existencia o un documento equivalente (por ejemplo un Certificado de Solvencia Moral) debidamente autenticado por el Secretario de Estado u otro funcionario que tenga la custodia de los archivos de la Compañía de Responsabilidad Limitada en el Estado o en el país bajo cuyas leyes se ha constituido. Este certificado no debe tener una fecha superior a dos (2) meses antes de fecha de la solicitud que se ha radicado en éste Estado.	
Fecha de firma: 4/21/09 Cargo del firmante: ASESOR GENERAL	Compañía de Responsabilidad Limitada CYTOTECH LABS, LLC FIRMADO ILEGIBLE. NOMBRE: ERNEST R. MARTINEZ
Derechos de radicación \$50 por miembro/ radicación mínima \$300, máxima \$3.000	
SS-4233 (REV 02/08) RDA 2458	



ESTADO DE TENNESSEE
TRE HARGETT, SECRETARIO DE ESTADO
DIVISION DE SERVICIOS COMERCIALES
312 ROSA L. PARKS AVENUE
6TH FLOOR, WILIAM R. SNODGRASS TOWER
NASHVILLE, TN 37243

INFORMACION DE RADICACION

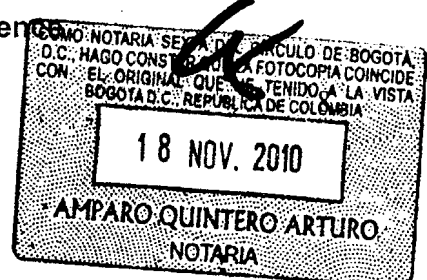
NOMBRE: CYTOTECH LABS, LLC	Información Local: Delaware
Información General	Fecha de formación: 10/26/2006
# Control: 600968	Cierre del año fiscal: 12
Tipo de Radicación: Compañía de Responsabilidad Limitada – Extranjera	Miembros: 6
Fecha de Radicación: 04/22/2009 2:25 pm	
Situación: Activa	
Duración: Perpetua	
Dirigida por: Gerente	
Dirección Agente registrado: ERNEST R. MARTINEZ ESQ. 1845 ELM HL PIKE NASHVILLE, TN 37210 USA	Dirección Principal: 1845 ELM HL PIKE NASHVILLE, TN 37210 USA Teléfono: (615) 8722775
Los siguientes documentos fueron radicados en éste despacho en la fecha indicada a continuación:	

Fecha de Radicación	Descripción	# Imagen
02/23/2010	Informe Anual 2009	6658-2210
Los miembros cambiaron de 1 Miembro a 6 Miembros		
04/23/2009	Informe Anual 2008	6625-1143
04/22/2009	Radicación inicial	65-25-0706

Nombres inventados activos

Fecha

Vente



20

TRADUCCIÓN OFICIAL NO.871/2010.-

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO QUE "CYTOTECH LABS, LLC" HA SIDO CONSTITUIDA BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE SOLVENCIA MORAL Y HA EXISTIDO LEGALMENTE, EN LO QUE DEMUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, DESDE EL DÍA 26 DE ABRIL DE 2009.

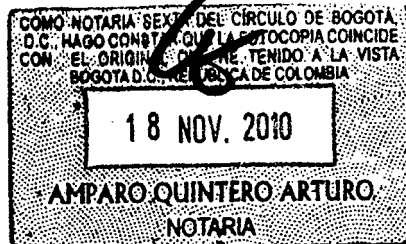
FIRMADO: JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARIO DE ESTADO

AUTENTICACION 7255265

FECHA: 20 DE ABRIL DE 2010

HAY SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE

4242094 8300 090379773





otorgado el día 22 de octubre de 2010, por.
CYTOTECH LABS, LLC documento que está
debidamente legalizado por Apostilla. -----

Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**,
domiciliada en Bogotá, identificada como aparece

al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta
escritura pública. -----

hasta aquí la minuta presentada (e-mail)

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leída la presente escritura por la
compareciente y advertido sobre las formalidades y trámites de rigor, le impartió
su aprobación y en constancia la firma por ante mí y conmigo el Notario que la
autoriza. -----

COMPROBANTES FISCALES.- El Notario certifica que se cumplió con lo
dispuesto al respecto por las disposiciones legales vigentes sobre la materia.

DERECHOS NOTARIALES.- Resolución N° 10301 del 17 de diciembre de
2009, \$ 42.860.00- - - - - IVA: \$ 22.263.00- - - - -

PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió de acuerdo con la minuta
presentada y queda protocolizada en las hojas de papel autorizado números:

7-700073-096117 - 7-700073-096100 - - - - -

Enmendado : "EML, Nashville ", Vale.

EN BLANCO... EN BLANCO


ADRIANA ZAPATA GIRALDO

CC.No. **SI 6K0061**

Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**





AMPARO CUERVO ARTURO

NOTARIO SEXTO (6°) DE BOGOTA D.C.

Digitó	Mile Atuesta/ año 2010/ PODER /
Revisó	<i>Jaime</i>
Identificó	
Cerro	<i>HE</i>



COPIA FOTOCOPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA
RELEVANCIA NÚMERO 0112 DE FECHA NOVIEMBRE 18 DE 2010.

COPIA QUE EXISTE CON DESTINO AL INTERESADO EN 16 HOJAS RUBRICADAS
EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCACIÓN
SUSCRIPTA O CANCELACIÓN POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER
EN ELLO CONTENIDO.

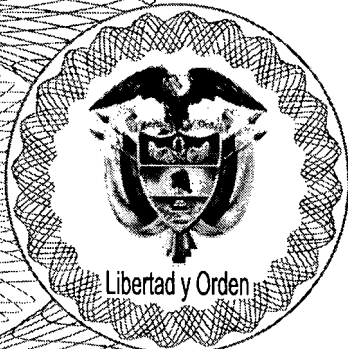
BOGOTÁ D.C. FEBRERO 23 DE 2012

LA SOLUCIÓN DE LA FOLIA

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA.



22

REPÚBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **AGUILERA DE PIEDRAHITA HILDA KUCIA**
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
(At: - À:)

El: **3/15/2012 11:50:52 AM**
(On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LMDP115052956**
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **1584133**
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **3**
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100124398501122

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

24
23

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country:* United States of America
This public document
2. *has been signed by:* Kathryn M. Clarke
3. *acting in the capacity of:* Notary Public
4. *bears the seal/stamp of:* Kathryn M. Clarke
whose commission expires on: January 13, 2017

Certified

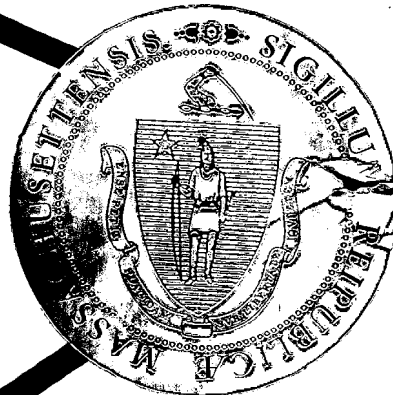
5. *at:* Boston, Massachusetts
6. *the:* 28 February, 2012
7. *by:* the Secretary of the Commonwealth
8. *No.:* 1584133
9. *Seal/stamp:*

Great Seal of the Commonwealth

10. *Signature:*

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



8
24

(117732-02629)

IN THE PATENT OFFICE OF COLOMBIA

Assignee(s): Cytotech Labs, LLC

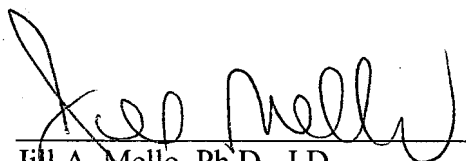
Inventor(s): Rangaprasad Sarangarajan, et al.

Serial No.: US 12/868678

Filed: 25 August 2012

Title: METHODS FOR TREATMENT OF A SARCOMA USING AN
EPIMETABOLIC SHIFTER (COENZYME Q10)

I, Jill A. Mello, Ph.D., J.D., attorney for the applicant, hereby attest that the attached document is a true and exact copy of the Assignment executed by inventors, **Rangaprasad Sarangarajan, Niven Rajin Narain and John Patrick McCook**. The Assignment is from said inventor(s) to **Cytotech Labs, LLC**, a corporation organized and existing under the laws of Delaware.


Jill A. Mello, Ph.D., J.D.
Registration No. 55,450
Attorney for Applicant

United States of America)
Commonwealth of Massachusetts) ss.:
Country of Suffolk)

On the 28 day of February 2012 before me, the undersigned notary public, personally appeared Jill Mello (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was that she is known to me personally, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

 (official signature and seal of notary)
Kathryn Marie Clarke
My commission expires January 13, 2017



28
125

ASSIGNMENT BY INVENTORS

WE, Rangaprasad SARANGARAJAN, Niven Rajin NARAIN, and John Patrick MCCOOK, of
Boylston, Massachusetts; Cambridge, Massachusetts; and Frisco, Texas, respectively, in
consideration of One Dollar and other valuable consideration paid to us by

Cytotech Labs, LLC

a Corporation of Delaware, having its principal place of business at 1845 Elm Hill Pike,
Nashville, Tennessee 37210, the receipt of which is hereby acknowledged, do hereby sell,
assign and transfer unto said

Cytotech Labs, LLC

its successors and assigns, the entire interest for the United States of America and all foreign
countries including all rights of priority under the International Convention for the Protection
of Industrial Property in a certain invention or improvement in

METHODS FOR TREATMENT OF A SARCOMA USING AN EPIMETABOLIC SHIFTER (COENZYM Q10)

described in an application

☐ Executed by us of even date herewith and about to be filed

or

☒ Application No. 12/868678, filed on August 25, 2010

This application claims the benefit of the following provisional application(s):

☒ Application No. 61/236845, filed on August 25, 2009

in the United States Patent and Trademark Office, and in all Letters Patent of the United States
and all foreign countries which may or shall be granted on said invention, or any parts thereof,
or on said application, or any divisional, continuing, reissue or other applications based in
whole or in part thereon. And we agree, for ourselves and our executors and administrators,
with said Corporation and its successors and assigns but at its or their expense and charges,
hereafter to execute all applications, amended specifications, deed or other instrument, and to
do all acts necessary or proper to secure the grant of Letters Patent in the United States and in
all other countries to said Corporation, with specifications and claims in such form as shall be
approved by the counsel of said Corporation and to vest and confirm in said Corporation, its
successors and assigns, the legal title to all such patents.

27
26

U.S.S.N. 12/868678

Attorney Docket No. 117732-02602

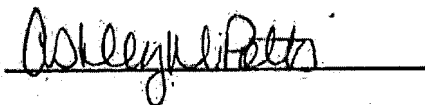
And we do hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States to issue such Letters Patent as shall be granted upon said application or applications based thereon to said Corporation, its successors and assigns.

7 April, 2011
Date

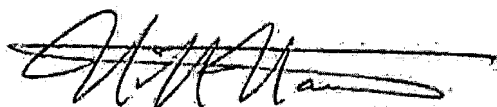

Rangaprasad SARANGARAJAN

Witness:

April 7, 2011
Date

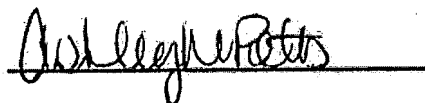


04/07/2011
Date


Niven Rajin NARAIN

Witness:

04/7/2011
Date



28
27

U.S.S.N. 12/868678

Attorney Docket No. 117732-02602

April 7, 2011
Date

John Patrick MCCOOK
John Patrick MCCOOK

Witness:

April 7, 2011
Date

Carl Runk

29
28

Traducción Oficial No. 2012/072 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Hilda Aguilera de Piedrahita, traductora oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y autorizada por el Ministerio de Justicia y del Derecho por Resolución No. 323 de 1980.

(117732-02629)

EN LA OFICINA DE PATENTES DE COLOMBIA

Cesionario(s): Cytotech Labs, LLC
Inventor(es): Rangaprasad Sarangarajan, *et al.*
Serie No. US 12/868678
Presentado: Agosto 25, 2012.
Titulo: METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA USANDO VARIADOR
EPIMETABOLICO (COENZIMA Q10)

Yo, Jill A. Mello, Ph.D., J.D., apoderado del solicitante, por el presente certifico que el documento adjunto es una copia fiel y correcta de la Cesión suscrita por los inventores, Rangaprasad Sarangarajan, Niven Rajin Narain y John Patrick McCook. La Cesión es de dichos inventores a Cytotech Labs, LLC, una sociedad organizada y existente bajo las leyes de Delaware.

(Firmado)
Jill A. Mello, Ph.D, J.D.
Registro No. 55,450
Apoderado del Solicitante

Estados Unidos de América)
Mancomunidad de Massachusetts) s.s.:
Condado de Suffolk)

El día 28 de Febrero de 2012, ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente Jill Mello (nombre del signatario del documento), probó ante mí bajo evidencia satisfactoria de identificación, la cual fue que la conozco personalmente, ser la persona cuyo nombre está firmado en el documento precedente o adjunto en mi presencia.

(Firmado) (Firma oficial y sello del notario)
Kathryn Marie Clarke
Mi Comisión expira el 13 de Enero de 2017.
Sello a tinta: KATHRYN M. CLARKE, Notario Público, Mancomunidad de Massachusetts, Mi Comisión expira el 13 de Enero de 2017.

CESION POR INVENTORES

NOSOTROS, Rangaprasad SARANGARAJAN, Niven Rajin NARAIN, y John Patrick MCCOOK, de Boylston, Massachusetts; Cambridge, Massachusetts; y Frisco, Texas, respectivamente, en contraprestación de Un Dólar y otra contraprestación valorable pagada a nosotros por

Cytotech Labs, LLC

Una sociedad de Delaware, teniendo su lugar principal de negocios en 1845 Elm Hill Pike, Nashville, Tennessee 37210, cuyo recibo se reconoce por el presente, por este medio vendemos, cedemos y transferimos al mencionado

TRADUCCION OFICIAL No. 2012/072
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
P.O. BOX 10000 EL MONTE DE JUSTICIA

Cytotech Labs, LLC

Sus sucesores y cesionarios, el completo interés para los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros incluyendo todos los derechos de prioridad bajo la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial en una cierta invención o mejoras en

METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA USANDO VARIADOR EPIMETABOLICO
(COENZIMA Q10)

Descrita en la solicitud

___ Suscrita por nosotros en la misma fecha del presente y la cual va a ser presentada

o

X Solicitud No. 12/868678, presentada el 25 de Agosto de 2010

Esta solicitud reivindica el beneficio de las siguientes solicitud(es) provisionales:

X Solicitud No. 61/236845, presentada el 25 de Agosto de 2009

en la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, y en todos los certificados de patentes de los Estados Unidos y todos los países extranjeros, las cuales puedan ser otorgadas sobre tales invenciones, o cualesquiera partes de la misma, o sobre tal solicitud, o cualquier división, continuación o re-expedición u otra solicitud con base en la totalidad o parte de la misma. Y nosotros acordamos, por nosotros mismos y nuestros albaceas y administradores, con la mencionada sociedad y sus sucesores y cesionarios, pero a su costa y cargo, en adelante, el suscribir todas las solicitudes , especificaciones reformadas, escrituras y otros instrumentos, y realizar todos los actos necesarios o apropiados para asegurar el otorgamiento de los Certificados de patente en los Estados Unidos y en todos los demás países extranjeros para dicha Sociedad, con especificaciones y reivindicaciones en tales formatos como sean aprobados por el asesor de la mencionada Sociedad e invertir y confirmar en la mencionada Sociedad, sus sucesores y cesionarios, el titulo legal de todas las mencionadas patentes.

Y nosotros por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de marcas y patentes de los Estados Unidos emitir los mencionados Certificados de Patente como puedan ser otorgados sobre tal solicitud o solicitudes con base en ella a la mencionada Sociedad, sus sucesores y cesionarios.

Abril 7, 2011 (Firmado)
Fecha Rangaprasad SARANGARAJAN

Testigo:
Abril 7, 2011 (Firmado)
Fecha

04/07/2011 (Firmado)
Fecha Niven Rajin NARAIN

Testigo:
04/07/2011 (Firmado)
Fecha

TRADUCCION OFICIAL No. 2012/072
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
SECRETARÍA DE JUSTICIA

Abril 7, 2011
Fecha

(Firmado)
John Patrick MCCOOK

Testigo:
Abril 7, 2011
Fecha

(Firmado)

La Mancomunidad de Massachusetts
William Francis Galvin
Secretario de la Mancomunidad
APOSTILLA
(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)

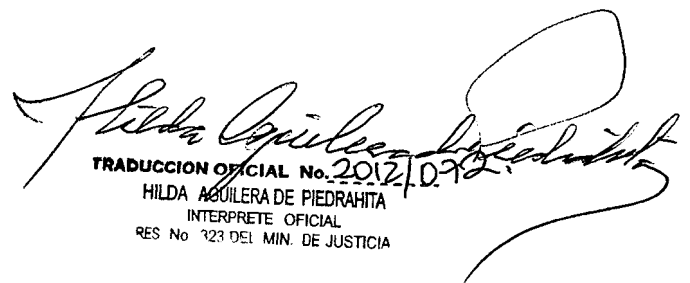
1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Kathryn M. Clarke
3. Actuando en calidad de Notario Público
4. Lleva el sello/la estampilla de Kathryn M. Clarke cuya comisión expira el 13 de Enero de 2012.

CERTIFICADO

5. en Boston, Massachusetts
6. el 28 de Febrero de 2012.
7. Por el Secretario de la Mancomunidad
8. No. **1584133**
9. Sello (Gran Sello de la Mancomunidad)
10. Firma (Firmado)
William Francis Galvin
Secretario de la Mancomunidad

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, D.C., Marzo 13 de 2012.


TRADUCCION OFICIAL No. 2012/072
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES No 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

32
31

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/031503 A3

- (51) International Patent Classification:
A61K 31/122 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/046711
- (22) International Filing Date:
25 August 2010 (25.08.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/236,845 25 August 2009 (25.08.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CY-
TOTECH LABS, LLC [US/US]; 1845 Elm Hill Pike,
Nashville, TN 37210 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SARANGARA-
JAN, Rangaprasad [US/US]; 21 Winifreds Way, Rut-
land, MA 01543 (US). NARAIN, Niven, Rajin [GY/US];
350 Third Street, Suite 2005, Cambridge, MA 02142
(US). MCCOOK, John, Patrick [US/US]; 4913 South-
ern Hills Drive, Frisco, TX 75034 (US).
- (74) Agents: HANLEY, Elizabeth, A. et al.; McCarter & En-
glish, LLP, 265 Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

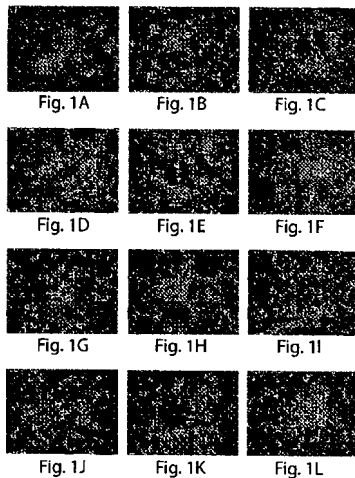
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

(88) Date of publication of the international search report:
21 July 2011

(54) Title: METHODS FOR TREATMENT OF A SARCOMA USING AN EPIMETABOLIC SHIFTER (COENZYME Q10)



(57) Abstract: Methods and formulations for treating a sarcoma in humans using an epimetabolic shifter, such as Coenzyme Q10, a building block of CoQ10, a derivative of CoQ10, an analog of CoQ10, a metabolite of CoQ10, or an intermediate of the coenzyme biosynthesis pathway, are described. Methods for assessing the efficacy of treatment of, diagnosing, and prognosing sarcoma are also provided.

WO 2011/031503 A3

38
32

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/031503 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 31/122 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/046711

(22) International Filing Date:
25 August 2010 (25.08.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/236,845 25 August 2009 (25.08.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **CYTOTECH LABS, LLC** [US/US]; 1845 Elm Hill Pike, Nashville, TN 37210 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SARANGARAJAN, Rangaprasad** [US/US]; 21 Winifreds Way, Rutland, MA 01543 (US). **NARAIN, Niven, Rajin** [GY/US]; 350 Third Street, Suite 2005, Cambridge, MA 02142 (US). **MCCOOK, John, Patrick** [US/US]; 4913 Southern Hills Drive, Frisco, TX 75034 (US).

(74) Agents: **HANLEY, Elizabeth, A. et al.**; McCarter & English, LLP, 265 Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).

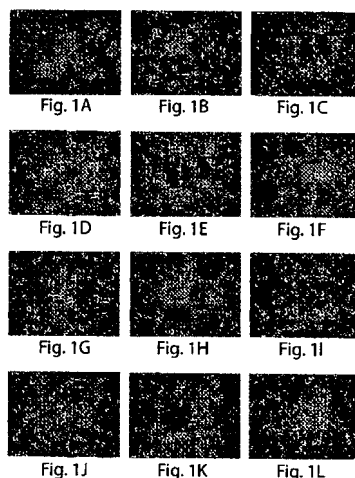
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: METHODS FOR TREATMENT OF A SARCOMA USING AN EPIMETABOLIC SHIFTER (COENZYME Q10)



(57) Abstract: Methods and formulations for treating a sarcoma in humans using an epimetabolic shifter, such as Coenzyme Q10, a building block of CoQ10, a derivative of CoQ10, an analog of CoQ10, a metabolite of CoQ10, or an intermediate of the coenzyme biosynthesis pathway, are described. Methods for assessing the efficacy of treatment of, diagnosing, and prognosing sarcoma are also provided.

WO 2011/031503 A2

**MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA UTILIZANDO
UN CAMBIADOR EPIMETABÓLICO (COENZIMA Q10)**

Solicitudes Relacionadas:

5 Esta solicitud reivindica la prioridad para la Solicitud Provisional Estadounidense No. de Serie 61/236,845, presentada el 25 de agosto, 2009, titulada "Métodos para el Tratamiento de un Sarcoma Utilizando un Cambiador Epimetabólico (Coenzima Q10)" (Expediente de Abogado No.: 117732-02601). Los contenidos de la anterior solicitud se incorporan aquí como referencia.

10

Antecedentes de la Invención:

El cáncer actualmente es una de las causas que llevan a la muerte en las naciones desarrolladas y es una grave amenaza para la sociedad moderna. Los sarcomas, en particular, representan un grupo heterogéneo de neoplasias con
15 origen en células mesenquimales que se desarrollan en los sitios principales en todo el cuerpo que incluye el sistema músculo-esquelético, músculo liso, huesos y cartílago. Los tumores de la familia Ewing (EFT) representan una familia de neoplasmas malignos de células morfológicamente redondas pequeñas que incluyen el Sarcoma de Ewing clásico (ES) del hueso, Ewing extraóseo (EOE), y
20 los Tumores Neuroectodérmicos Primitivos (PNET). Ellos representan casi el 3% de cánceres pediátricos y la segunda neoplasia más común en niños y adolescentes. La frecuencia del Sarcoma de Ewing es alrededor de 1 - 3 casos/millones en el Hemisferio occidental. Aunque los avances considerables en el tratamiento del Sarcoma de Ewing han incrementado los índices de
25 supervivencia a 5 años, los resultados para los pacientes con Ewing con enfermedad metastásica siguen siendo alarmantes con menos de 25% de sobrevivir más allá de 5 años.

El Sarcoma de Ewing una incidencia de cáncer altamente agresivo no
30 parece estar asociado con la herencia Mendeliana, ambiente o exposición a fármaco. La característica más consistente del Sarcoma de Ewing es la presencia de un gen de fusión como un resultado de la translocación cromosómica entre el sitio EWSR1 y el gen de factor de transcripción ETS. Los genes de fusión EwS-ETS codifican los factores de transcripción tales como EWS-FLI1, cuyo funcionamiento
35 aberrante se asocia con la patogénia del Sarcoma de Ewing.

Aunque las investigaciones recientes han aumentado enormemente nuestra comprensión de muchos de los mecanismos moleculares de la tumorigenia y ha

proporcionado numerosas nuevas posibilidades para el tratamiento de cáncer, los tratamientos estándar para la mayoría de las neoplasias, que incluyen los tumores de la familia de Ewing, incluyen resección quirúrgica, quimioterapia, y radioterapia. Cada uno de estos tratamientos puede provocar numerosos efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, la cirugía puede resultar en dolor, lesión traumática en el tejido sano, y la cicatrización. La terapia de radiación tiene la ventaja de matar las células neoplásicas pero también daña el tejido no neoplásico al mismo tiempo. La quimioterapia implica la administración de varios fármacos antineoplásicos a un paciente. Estos tratamientos estándar a menudo son acompañados por efectos secundarios adversos, por ejemplo, náusea, supresión inmune, ulceración gástrica y tumorigenia secundaria.

Con los años, muchas personas y compañías han llevado a cabo una investigación exhaustiva en busca de mejoras en los tratamientos para la amplia gama de cánceres, que incluyen los tumores de la familia de Ewing. Las compañías están desarrollando agentes bioactivos que incluyen entidades químicas, por ejemplo, moléculas, pequeñas y agentes biológicos, por ejemplo, anticuerpos, con el deseo de proporcionar terapias más benéficas para el cáncer. Por ejemplo, los anticuerpos del receptor de factor crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R) están siendo investigados como terapia potencial, solo y en combinación con otras quimioterapias estándar, para el tratamiento de los tumores de la familia de Ewing recurrentes. Hasta la fecha, sin embargo, los tumores de la familia de Ewing siguen siendo muy difíciles de tratar. De acuerdo con lo anterior, existe una importante necesidad para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento exitoso del sarcoma de Ewing.

La Coenzima Q10, también denominada aquí como CoQ10, Q10, ubiquinona, o ubidecarenona, es un complemento nutricional popular y se puede encontrar en la forma de cápsula en las tiendas nutricionistas, tiendas de alimentos saludables, farmacias, y similares, como un complemento similar a vitamina para ayudar a proteger el sistema inmune a través de las propiedades antioxidantes del ubiquinol, la forma reducida de CoQ10. CoQ10 se reconoce en la técnica y se describe adicionalmente en la Publicación Internacional No. WO 2005/069916, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia. El Metabolismo y la función de CoQ10, que incluye metabolitos de CoQ10, se describen en Turunen *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660: 171-199 (2004), cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

La CoQ10 se encuentra en la mayoría de tejidos del cuerpo humano y los tejidos de otros mamíferos. La distribución de tejido y el estado de reducción de la CoQ10 en los humanos se ha revisado en un artículo por Bhagavan HN, *et al.*, Bhagavan HN, *et al.*, *Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetic*, Free Radical Research 40(5), 445-453 (2006) (en lo sucesivo, Bhagavan, *et al.*). Los autores reportan que "como una regla general, los tejidos con altos requerimientos de energía o actividad metabólica tales como el corazón, riñón, hígado y músculo contienen concentraciones relativamente altas de CoQ10." Los autores reportan adicionalmente que "[a] la mayor porción de CoQ10 en los tejidos está en la forma reducida como la hidroquinona o ubiquinol, con la excepción del cerebro y pulmones," que aparece por ser una reflexión de la tensión oxidativa incrementada en los dos tejidos." En particular, Bhagavan *et al.* reporta que en el corazón, riñón, hígado, músculo, intestino y sangre (plasma), aproximadamente 61%, 75%, 95%, 65%, 95% y 96%, respectivamente, de CoQ10 está en la forma reducida. De manera similar, Ruiz-Jiminez, *et al.*, *Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem espectrometría de masa to evaluate the oxidative stress*, J. Chroma A 1175(2), 242-248 (2007) (en lo sucesivo Ruiz-Jiminez, *et al.*) reporta que cuando se evalúa el plasma humano para Q10 y la forma reducida de Q10 (Q10H2), se encuentra la mayoría (90%) de las moléculas en la forma reducida.

La CoQ10 es muy lipófila, para la mayor parte, insoluble en agua. Debido a su insolubilidad en el agua, solubilidad limitada en los lípidos y en lípidos, y relativamente gran peso molecular, la eficiencia de absorción de CoQ10 administrado oralmente es pobre. Bhagavan, *et al.* reporta que "en un estudio con ratas se reporta que se adsorbe solo aproximadamente 2-3% de CoQ10 administrado oralmente." Bhagavan, *et al.* reporta adicionalmente que "los datos de los estudios en ratas indican que la CoQ10 se reduce a ubiquinol ya sea durante o luego de la absorción en el intestino."

30

Se ha asociado la CoQ10 con cáncer en la bibliografía durante muchos años. Se describen adelante algunos ejemplos representativos pero no inclusivos de las asociaciones reportadas en la literatura. Karl Folkers, *et al.*, *Survival of Cancer Patients on Therapy with Coenzyme Q10*, Biochemical and Biophysical Research Communication 192, 241-245 (1993) (en lo sucesivo "Folkers, *et al.*") describe ocho historias de casos de pacientes con cáncer "en terapia con CoQ10" y sus historias de supervivencia..." durante periodos de 5-15 años." La CoQ10 se administra oralmente a ocho pacientes que tienen diferentes tipos de cáncer, que

35

incluye carcinoma pancreático, adenocarcinoma, carcinoma laríngeo, cáncer de mama, colon, pulmón y próstata. Folkers, *et al.* establece que "estos resultados no justifican protocolos sistémicos." Lockwood, *et al.*, *Progress on Therapy of Breast Cancer with Vitamin Q10 and the Regression of Metastases*, Biochemical and Biophysical Research Communication 212, 172-177 (1995) (en lo sucesivo "Lockwood, *et al.*") es otro artículo de revisión que reporta sobre "el progreso en la terapia de cáncer de mama con Vitamina Q10". Lockwood, *et al.* se refiere a Folkers, *et al.*, en que "cubre 35 años de investigación internacional sobre animales y humanos que revela niveles variables de vitamina Q10 en tejidos con tumor y sin tumor e incluye datos sobre la vitamina Q10 que son intrínsecos al sistema de defensa del anfitrión, ya que se basa en los sobrevivientes en incremento de ratones con tumores tratados". Lockwood, *et al.* establece adicionalmente que "el potencial de la terapia con vitamina Q10 del cáncer humano llegó a ser evidente en 1961" confiando en un estudio que determina los niveles de CoQ10 en sangre en 199 pacientes con cáncer suecos y americanos que revelan niveles variables de deficiencias en los casos de cáncer de mama. La Patente Estadounidense No.6,417,233, otorgada el 9 de julio, 2002 (en lo sucesivo Sears, *et al.*) describe composiciones que contienen benzoquinonas solubles en lípidos, por ejemplo, coenzima Q10, para la prevención y/o tratamiento de mitocondriopatías. Sears, *et al.* establece que "ha sido reportado el tratamiento con CoQ10 por proporcionar algunos beneficios en pacientes con cáncer (ver columna 2, líneas 30-31)."

A partir de la fecha de presentación de esta solicitud, el National Cancer Institute reporta que no se han conducido ensayos clínicos bien diseñados que involucren grandes números de pacientes de CoQ10 en tratamiento contra el cáncer debido a que "la forma en que se hacen los estudios y la cantidad de información reportada hace que no sea claro si los beneficios son provocados por la coenzima Q10 o por cualquier otra cosa en su lugar." Ver The National Cancer Institute (NCI), disponible en www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/coenzymeQ10/paciente/allpages (Septiembre 29, 2008). En particular, el cita tres pequeños estudios sobre el uso de CoQ10 como una terapia adyuvante después del tratamiento estándar en los pacientes con cáncer de mama, en el que algunos pacientes parecen ser ayudados por el tratamiento, y reitera que "la debilidad en el diseño del estudio y la información, sin embargo, no establecen claramente si los beneficios son provocados por la coenzima Q10 o por cualquier otro en su lugar." El NCI especifica que "estos estudios tienen las siguientes debilidades: los estudios no

fueron controlados o aleatorios, los pacientes utilizan otros suplementos, además de la coenzima Q10, los pacientes recibieron tratamientos estándar antes o durante el tratamiento con coenzima Q10, y no se informaron todos los detalles de los pacientes en los estudios". NCI reporta adicionalmente "informes anecdóticos de la coenzima Q10 ha ayudado a algunos pacientes con cáncer a que vivan más tiempo, incluso en pacientes con cáncer de páncreas, pulmón, colon, recto y próstata", pero afirma que "los pacientes descritos en estos informes, sin embargo, también recibieron otros tratamientos diferentes a la coenzima Q10, que incluyen quimioterapia, radioterapia y cirugía.

La publicación de solicitud de patente EE.UU. 2006/0035981, publicada en febrero 16, 2006 (en adelante "Mazzio 2006") se describe los métodos y formulaciones para tratar o prevenir cánceres humanos y animales utilizando composiciones que explotan la vulnerabilidad de los tipos de cáncer con respecto a su requerimiento anaeróbico de la fosforilación de glucosa no-oxidativa para suministrar energía, que es opuesta al anfitrión. Las formulaciones de Mazzio 2006 contienen uno o más compuestos que promueven sinérgicamente el metabolismo oxidativo y/o impiden el metabolismo de la deshidrogenasa ácido láctico o de la glucosa anaeróbica y más particularmente se describe como que contiene "2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (aquí también se denomina "DMBQ") (base quinoide) y las opciones para la serie de ubiquinona entera, que incluye las hidroquinonas, ubicromenoles y ubicromanoles o derivados y análogos naturales/sintetizados correspondientes. Ver Mazzio 2006 en la página 3, párrafo 0010. Mazzio 2006 establece "la cadena corta de ubiquinonas (CoQ <3) como agentes antineoplásicos y aún establece adicionalmente que "2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (DMBQ) tiene un exceso de 1000 veces más potente que la CoQ10 como un agente antineoplásico ". Ver Mazzio de 2006 en la página 3, párrafo 0011. Mazzio 2006 establece adicionalmente que el estudio "no encontró que CoQ10 sea tan letal como se esperaba" y como "los estudios previos que han utilizado CoQ10 contra el cáncer han sido un tanto contradictorios". Ver Mazzio de 2006 en las páginas 3-4 para una extensa lista de referencias bibliográficas que apoyan esta declaración.

La publicación de la solicitud EE.UU. 2007/0248693, publicada el 25 de octubre 2007 (en adelante "2007 Mazzio") también describe composiciones de nutraceuticos y su uso para tratar o prevenir el cáncer. De nuevo, esta solicitud de patente publicada se centra en las ubiquinonas de cadena corta y, específicamente, establece que la CoQ10 no es un componente crítico de esta

invención. De acuerdo con Mazzio 2007, "aunque el CoQ10 puede aumentar la Vmax de la actividad mitocondrial del complejo II en las células neoplásicas (Mazzio y Soliman, Biochem Pharmacol 67: 1167-84, 2004), esto no controla el ritmo de la respiración mitocondrial o la utilización de O₂ a través del complejo I y, CoQ10 no era tan letal como se esperaba. Del mismo modo, los resultados de CoQ10 contra el cáncer han sido contradictorios. "Ver Mazzio de 2007 en la página 5, párrafo 0.019.

Los solicitantes han descrito previamente formulaciones tópicas de CoQ10 y métodos para reducir el índice de crecimiento de tumor en sujetos animales (Hsia et al, WO 2005/069916 publicada 4 de agosto, 2005). En los experimentos descritos en Hsia et al, CoQ10 como se muestra incrementan el índice de apoptosis en un cultivo de células neoplásicas de piel pero no en células normales. Más aún, el tratamiento de animales que llevan tumor con una formulación tópica de CoQ10 como se muestra reduce dramáticamente el índice de crecimiento de tumor en los animales. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en una comprensión más completa de la función de la CoQ10 en un humano y/o célula. En particular, los métodos y formulaciones de la presente invención se basan, por lo menos en parte, en el conocimiento ganado acerca del mecanismo terapéutico de la CoQ10 a partir de extensos estudios del tratamiento con CoQ10 de células de sarcoma *in vitro*.

Específicamente, en por lo menos una modalidad, los métodos y formulaciones de la presente invención se basan por lo menos en parte, en el descubrimiento sorprendente que la expresión de un número significativo de genes se modulan en las células de sarcoma principales tratadas con CoQ10. Estas proteínas moduladas se encuentran por estar agrupadas en varias rutas celulares, que incluyen la regulación de procesos celulares, procesos metabólicos, regulación de transcripción, muerte celular programada (apoptosis), desarrollo celular, desarrollo de citoesqueleto, núcleo, proteosoma y órgano. Tomados juntos, los resultados descritos aquí han proporcionado penetración en el mecanismo terapéutico de Q10. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, los resultados descritos aquí sugieren que la Coenzima Q10 induce expresión global de las proteínas del citoesqueleto, desestabilizando por lo tanto la arquitectura estructural de la célula e iniciando un programa celular que culmina en una respuesta apoptótica inusualmente e inesperadamente rápida y robusta.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona, en un aspecto, métodos para tratar o prevenir un sarcoma en humanos al administrar tópicamente una molécula de Coenzima Q10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención. En una modalidad, la administración tópica es a través de una dosis seleccionada para proporcionar eficacia en humanos para el sarcoma particular que se trata. En ciertas modalidades, el tratamiento o prevención del sarcoma ocurre por la administración de la forma oxidada de la Coenzima Q10.

En ciertas modalidades, el sarcoma que se va a tratar o prevenir no es un sarcoma que típicamente se trate o prevenga mediante administración tópica con la expectativa de suministro sistémico y de un agente activo en niveles terapéuticamente efectivos.

En algunas modalidades, la concentración de la molécula de Coenzima Q10 en los tejidos de los humanos que se tratan es diferente a aquella de un estándar de control de tejido humano representativo de un estado saludable o normal.

En ciertas otras modalidades de la invención, la forma de la molécula de Coenzima Q10 que se administra al humano es diferente de la forma predominante encontrada en la circulación sistémica dentro del humano.

En otra modalidad de la invención, el tratamiento implica o ocurre a través de una interacción de una molécula de Coenzima Q10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) con un gen (o proteína) seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, aSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4,

foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque
 5 térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg
 10 d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2,
 15 lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de
 20 Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1,
 25 subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK,
 30 ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de
 35 factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

En una modalidad, una molécula de Coenzima Q10 se administra en una dosis que induce apoptosis en las células del sarcoma durante por lo menos 1 hora luego de la administración de dicha molécula de Coenzima Q10 al humano. En otras modalidades, una molécula de Coenzima Q10 se administra en una dosis

5 que induce apoptosis en las células de sarcoma durante por lo menos aproximadamente 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas luego de la administración de Coenzima Q10 al humano.

10 En ciertas modalidades de la invención, se proporcionan métodos para tratar o prevenir un sarcoma en un humano al administrar tópicamente la Coenzima Q10 al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención, en donde al humano se administra una dosis típica de la Coenzima Q10 en un

15 vehículo tópico cuando se plica la coenzima Q10 al tejido objetivo en una dosis en el rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 miligramos de la Coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel. En una modalidad, se aplica a la Coenzima Q10 al tejido objetivo en una dosis en el rango de aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.15 mg de CoQ10 por centímetro cuadrado de piel. En

20 otra modalidad, se aplica a la Coenzima Q10 al tejido objetivo en una dosis de aproximadamente 0.12 miligramos de la Coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel.

En ciertas modalidades de la invención, el sarcoma que se va a tratar o prevenir es un tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing. En ciertas

25 modalidades, el tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing que se va a tratar o prevenir es sarcoma de Ewing.

Ciertos aspectos de la invención proporcionan métodos para tratar o prevenir un sarcoma en un humano al administrar tópicamente una molécula de

30 Coenzima Q10 al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención, en donde la molécula de Coenzima Q10 se aplica tópicamente una o más veces por 24 horas durante seis semanas o más.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir

35 un sarcoma en un humano, que comprende administrar Coenzima Q10 al humano de tal manera que se mantiene en su forma oxidada durante el tratamiento del sarcoma. En una modalidad, el sarcoma que se va a tratar no es un sarcoma típicamente tratado a través de administración tópica, por ejemplo, sarcoma de

Ewing, con la expectativa de suministro sistémico y de un agente activo en niveles terapéuticamente efectivos.

La presente invención proporciona, en todavía otro aspecto, métodos para
5 inhibir la actividad de la proteína de fusión generada por translocación entre el cromosoma 11 y 22 encontrados en el sarcoma de Ewing, es decir, la proteína de fusión EWS-FLI1. Estos métodos incluyen seleccionar o tratar un sujeto humano que sufre de un sarcoma y administrar a dicho humano una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de Coenzima Q10, inhibiendo de esta
10 forma la actividad de la proteína de fusión EWS-FLI1.

En ciertas modalidades, la molécula de Coenzima Q10 es un intermedio en la ruta de biosíntesis de CoQ10 que comprende: (a) benzoquinona o por lo menos una molécula que facilita la biosíntesis del anillo de benzoquinona, y (b) por lo
15 menos una molécula que facilita la síntesis de y/o adhesión de unidades de isoprenoide al anillo de benzoquinona. En otras modalidades, dicha por lo menos una molécula que facilita la biosíntesis del anillo de benzoquinona comprende: L-Fenilalanina, DL-Fenilalanina, D-Fenilalanina, L-Tirosina, DL-Tirosina, D-Tirosina, 4-hidroxi-fenilpiruvato, 3-metoxi-4-hidroximandelato (vanililmandelato o VMA),
20 ácido vanílico, piridoxina, o pantenol. En otras modalidades, dicha por lo menos una molécula que facilita la síntesis de y/o adhesión de unidades de isoprenoide al anillo de benzoquinona comprende: fenilacetato, 4-hidroxi-benzoato, ácido mevalónico, acetilglicina, acetil-CoA, o farnesilo. En otras modalidades, el intermedio comprende: (a) una o más de L-Fenilalanina, L-Tirosina, y 4-
25 hidroxifenilpiruvato; y, (b) uno o más de 4-hidroxi benzoato, fenilacetato, y benzoquinona. En otras modalidades, el intermedio: (a) inhibe la expresión Bcl-2 y/o promueve la expresión de Caspasa -3; y/o, (b) inhibe proliferación celular.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir
30 un sarcoma en un humano. Este método incluye administrar una molécula de Coenzima Q10 a un humano en necesidad de este en un régimen de dosificación de tal manera que se modula la permeabilidad de las membranas celulares del humano y ocurre tratamiento o prevención.

35 En algunas modalidades, los métodos para tratar o prevenir un sarcoma en un humano o para inhibir la actividad de la proteína de fusión EWS-FLI1 en un humano, incluyen adicionalmente regular en forma descendente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de LAMA5,

PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, proteína asociada a microtúbulo, beta tubulina, proteasoma alfa 3, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, proteína de choque térmico 27kD, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, y receptor de secuencia de señal 1 delta, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2 y VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Rad17, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), y MRP1, y/o regular de forma descendente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3 (homólogo 2 de canopia), enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinase 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), Neurolisina (NLN), MDC1, Laminina 2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3,

independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

En algunas modalidades de la invención, el método para tratar o prevenir un sarcoma en un humano o para inhibir la actividad de la proteína de fusión EWS-FLI1 en un humano, implica o ocurre a través de una interacción de una molécula de CoQ10 con un gen (o proteína) seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de

retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasa 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc- cputativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

15

En ciertas modalidades de la invención, los métodos incluyen adicionalmente un régimen de tratamiento que incluye una cualquiera de o una combinación de cirugía, radiación, terapia hormonal, terapia con anticuerpo, terapia con factores de crecimiento, citocinas, quimioterapia, y terapia con citoblasto alogénico. En todavía otro aspecto, la invención proporciona métodos para evaluar la eficacia de una terapia para tratar un sarcoma en un sujeto. Los métodos incluyen comparar el nivel de expresión de un marcador presente en una primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar por lo menos una porción del régimen de tratamiento al sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y el nivel de expresión del marcador presente en una segunda muestra obtenida del sujeto luego de la administración de por lo menos una porción del régimen de tratamiento, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la segunda muestra cuando se compara con la primer muestra es una indicación que la terapia es eficaz para tratar el sarcoma en el sujeto.

30

En todavía otro aspecto, la invención proporciona métodos para evaluar si un sujeto está afligido con un sarcoma. Los métodos incluyen determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, y comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una

35

modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una indicación que el sujeto está afligido con el sarcoma, por lo tanto evaluar si el sujeto está afligido con el sarcoma.

5

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para pronosticar si un sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma. Los métodos incluyen determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que
10 consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, y comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica
obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de
15 control es una indicación que el sujeto está predispuesto a desarrollar sarcoma, por lo tanto pronosticando si el sujeto está predispuesto a desarrollar el sarcoma.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona métodos para pronosticar la recurrencia de un sarcoma en un sujeto. Los métodos incluyen determinar el
20 nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, y comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una
25 modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una indicación de la recurrencia del sarcoma, pronosticando por lo tanto la recurrencia del sarcoma en el sujeto.

30 En un aspecto, la invención proporciona métodos que pronostican la supervivencia de un sujeto con un sarcoma. Los métodos incluyen determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, y comparar el nivel de expresión del
35 marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es

una indicación de la supervivencia del sujeto, pronosticando por lo tanto la supervivencia del sujeto con el sarcoma.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona métodos para monitorear el progreso de un sarcoma en un sujeto. Los métodos incluyen comparar, el nivel de expresión de un marcador presente en una primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar por lo menos una porción de un régimen de tratamiento al sujeto y el nivel de expresión del marcador presente en una segunda muestra obtenida del sujeto luego de la administración de por lo menos una porción del régimen de tratamiento, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, monitoreando por lo tanto el progreso del sarcoma en el sujeto.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona métodos para identificar un compuesto para tratar un sarcoma en un sujeto. Los métodos incluyen obtener una muestra biológica del sujeto, poner en contacto la muestra biológica con un compuesto de prueba, determinar el nivel de expresión de uno o más marcadores presentes en la muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 con un cambio de pliegue positivo y/o con un cambio de pliegue negativo, comparar el nivel de expresión de uno o más marcadores en la muestra biológica con un control apropiado, y seleccionar un compuesto de prueba que reduce el nivel de expresión de uno o más marcadores con un cambio de pliegue negativo presente en la muestra biológica y/o incrementa el nivel de expresión de uno o más marcadores con un cambio de pliegue positivo presente en la muestra biológica, identificando por lo tanto un compuesto para tratar el sarcoma en un sujeto.

En una modalidad, el sarcoma es un tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing. En una modalidad, el tipo de sarcoma es sarcoma de Ewing.

Muestras adecuadas para uso en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, un fluido, por ejemplo, fluidos sanguíneos, vómito, saliva, linfa, líquido quístico, orina, fluidos recogidos por lavado bronquial, fluidos recogidos por lavado peritoneal, y fluidos ginecológicos, obtenidos del sujeto. En una modalidad, la muestra es una muestra de sangre o un componente de la misma. Las muestras adecuadas para uso en los métodos de la invención también pueden incluir, por ejemplo, un tejido o componente del mismo, por ejemplo, óseo, tejido conjuntivo,

tejido de cartílago, pulmón, hígado, riñón, muscular, de corazón,, páncreas, y/o piel.

En una modalidad, el sujeto es un humano.

5

En una modalidad, el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica se determina al ensayar un polinucleótido transcrito o una porción del mismo, por ejemplo, al amplificar el polinucleótido transcrito, en la muestra.

10

En otra modalidad, el nivel de expresión del marcador en la muestra del sujeto se determina al ensayar una proteína o una porción del misma utilizando, por ejemplo, un reactivo, por ejemplo, un reactivo etiquetado, que se une específicamente con la proteína en la muestra. En una modalidad, el reactivo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.

15

En una modalidad, el nivel de expresión del marcador en la muestra se determina utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste de reacción de amplificación de reacción de cadena de polimerasa (PCR), análisis PCR de transcriptasa inversa, análisis de polimorfismo de conformación de ADN monocatenario (SSCP), detección de división de emparejamiento errado, análisis heterodúplex, análisis Southern blot, análisis Northern blot, análisis Western blot, hibridación in situ, análisis de matriz, secuenciamiento de ácido desoxirribonucleico, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, y combinaciones o subcombinaciones de los mismos, de dicha muestra.

25

En otra modalidad, el nivel de expresión del marcador en la muestra se determina utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, citometría de flujo, ELISA y espectrometría de masa.

30

En otra modalidad, el marcador es un marcador seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S 10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB 1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B I), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína

35

de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamin B I, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento

1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

5 En una modalidad, se determina el nivel de expresión de una pluralidad de marcadores.

En una modalidad, el sujeto se trata con una terapia seleccionada del grupo que consiste de un compuesto influenciador de entorno, cirugía, radiación, terapia hormonal, terapia con anticuerpo, terapia con factores de crecimiento, citocinas, 10 quimioterapia, y terapia con citoblasto alogénico.

En una modalidad, la terapia comprende un compuesto influenciador de entorno y, opcionalmente, comprende adicionalmente un régimen de tratamiento seleccionado del grupo que consiste de cirugía, radiación, terapia hormonal, 15 terapia con anticuerpo, terapia con factores de crecimiento, citocinas, quimioterapia y terapia con citoblasto alogénico.

El compuesto influenciador de entorno puede ser una molécula intracelular multidimensional (MIM), un cambiador epimetabólico (cambiador epi), una 20 molécula de CoQ10, vitamina D3, acetil Co-A, palmitilo, L-carnitina, tirosina, fenilalanina, cisteína, una molécula pequeña, fibronectina, TNF-alfa, IL-5, IL-12, IL-23, un factor angiogénico y/o un factor apoptósico.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un equipo para 25 evaluar si un sujeto está afligido con un sarcoma. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para evaluar si el sujeto está afligido con el sarcoma.

30

En un aspecto, la invención proporciona equipos para pronosticar si un sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e 35 instrucciones para el uso del equipo para pronosticar si el sujeto está predispuesto a desarrollar el sarcoma.

En otro aspecto, la invención proporciona equipos para pronosticar la recurrencia de un sarcoma en un sujeto. Los equipos incluyen reactivos para evaluar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la recurrencia del sarcoma.

En otro aspecto, la invención proporciona equipos para pronosticar la recurrencia de un sarcoma. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la recurrencia del sarcoma.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona equipos para pronosticar la supervivencia de un sujeto con un sarcoma. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la supervivencia del sujeto con el sarcoma.

En otro aspecto, la invención proporciona equipos para monitorear el progreso de un sarcoma en un sujeto. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar el progreso del sarcoma en un sujeto.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona equipos para evaluar la eficacia de una terapia para tratar un sarcoma. Los equipos incluyen reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para evaluar la eficacia de la terapia para tratar el sarcoma.

Los equipos de la invención pueden comprender adicionalmente medios para obtener una muestra biológica de un sujeto, una muestra de control, y/o un compuesto influenciador de entorno.

Los medios para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador puede comprender medios para ensayar un polinucleótido transcrito o una porción del mismo en la muestra y/o medios para ensayar una proteína o una porción del misma en la muestra.

5

En una modalidad, los equipos comprenden reactivos para determinar el nivel de expresión de una pluralidad de marcadores.

Breve descripción de los Dibujos:

10

Varias modalidades de la presente descripción se describirán adelante con referencia a las figuras en donde:

Figura 1: Imágenes de microscopía de células NCIES0808 de los diferentes grupos de tratamiento. (A) 3 horas Medios (B) 3 horas 50 uM de Q10 (C) 3 horas 100 uM de Q10 (D) 6 horas vehículo (E) 6 horas 50 uM de Q10 (F) 6 horas 100 uM de Q10 (G) 24 horas medios (H) 24 horas 50 uM de Q10 (I) 24 horas 100 uM de Q10 (J) 48 horas medios (K) 48 horas 50 uM de Q10 (L) 48 horas 100 uM de Q10 sin distintas diferencias en ya sea el número celular o morfología después de tratamiento con Q10 en cualquiera de los grupos.

20

Figura 2: Análisis de patrón de matrices de anticuerpo de ejemplo de las proteínas aisladas desde las células NCIES0808 tratadas con 50 µM de CoQ10 durante 3 horas.

25

Figura 3: Ejemplo de análisis de gel de electrofóresis del 2-D de células NCIES0808 tratadas con CoQ10 durante 24 horas. Se marcan los puntos extirpados para identificación.

30

Figura 4: Análisis Western blot de las proteínas aisladas desde las células NCIES0808 tratadas con 50 uM o 100 uM de CoQ10 durante 24 horas utilizando varios anticuerpos. (A) enzima que convierte Anti-Angiotensina (ACE) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-23908). (B) Anti-Caspasa 3 (abcam Inc., ab44976). (C) Anti-GARS (abcam Inc., ab42905). (D) Matriz Anti-Metaloproteinase 6 (MMP-6) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-101453). (E) Dominio Catalítico Anti-Neurolisina (NON) (abcam Inc., ab59523). (F) Anti-Neurolisina (NLN) (abcam Inc., ab59519).

35

54
57

Figura 5: (A) Red de interacciones de proteína para proteínas EWS y FLU.
(B) Red de interacciones de proteína para proteína ANGPTL3.

Descripción detallada de la Invención:

5

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente invención, se definen primero ciertos términos.

I. Definiciones

10

Como se utiliza aquí, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con éste en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir a por lo menos uno) del objeto gramático del artículo. Por vía de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El término “que incluye” se utiliza aquí para significar, y se utiliza de forma intercambiable con, la frase “que incluye pero no se limita a”.

20

El término “o” se utiliza aquí para significar, y se utiliza de forma intercambiable con, el término “y/o,” a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “tal como” se utiliza aquí para significar, y se utiliza de forma intercambiable, con la frase “tal como pero no limitado a”.

Un “paciente” o “sujeto” que se va a tratar mediante el método de la invención puede significar ya sea un humano o animal no humano, preferiblemente un mamífero. Se debe notar que las observaciones clínicas descritas aquí se hacen con sujetos humanos y, en por lo menos algunas modalidades, los sujetos son humanos.

“Cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. Cuando se administra para prevención de una enfermedad, la cantidad es suficiente para evitar o retardar el inicio de la enfermedad. La “cantidad terapéuticamente efectiva” variará

dependiendo del compuesto, la enfermedad y su severidad y la edad, peso, etc., del paciente que se va a tratar.

“Prevenir” o “prevención” se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (es decir, que provoca por lo menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no desarrollada en un paciente que se expone a o está predispuesto a la enfermedad pero aún no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad).

El término tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” se refiere a la administración al sujeto de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal anfitrión) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al anfitrión contra el desarrollo de la afección no deseada, si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, está destinado a disminuir, aliviar, mantener la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

El término “efecto terapéutico” se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente humanos provocado por una sustancia farmacológicamente activa. El término así significa cualquier sustancia destinada para uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad o en la mejora del desarrollo físico o mental y las condiciones en un animal o humano. La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” significa que cantidad de tal una sustancia que produce algún efecto local o sistémico deseado en una relación riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento. En ciertas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto dependerá de su índice terapéutico, solubilidad, y similares. Por ejemplo, ciertos compuestos descubiertos por los métodos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad suficiente para producir una relación riesgo/beneficio razonable aplicable a tal tratamiento.

Por “paciente” se entiende cualquier animal (por ejemplo, un humano), que incluye caballos, perros, gatos, cerdos, cabras, conejos, hámsters, monos, conejillos de indias, ratas, ratones, lagartos, serpientes, ovejas, vacas, peces y aves.

“Ruta metabólica” se refiere a una secuencia de reacciones mediadas por enzima que transforman un compuesto en otro y proporcionan intermedios y energía para las funciones celulares. La ruta metabólica puede ser lineal o cíclica.

5 “Estado metabólico” se refiere al contenido molecular de un entorno celular, multicelular o de tejido particular en un punto dado en tiempo cuando se mide mediante varios indicadores químicos o biológicos ya que ellos se relacionan con un estado de salud o enfermedad.

10 El término “micromatriz” se refiere a una matriz de distintos polinucleótidos, oligonucleótidos, polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) o péptidos sintetizados sobre un sustrato, tal como papel, nylon u otro de membrana, filtro, chip, portaobjetos de vidrio, o cualquier otro soporte sólido adecuado.

15 Los términos “trastornos” y “enfermedades” se utilizan inclusivamente y se refieren a cualquier desviación de la estructura o función normal de cualquier parte, órgano o sistema del cuerpo (o cualquier combinación de las mismas). Una enfermedad específica se manifiesta mediante síntomas y signos característicos, que incluyen cambios biológicos, químicos y físicos, y a menudo se asocian con
20 una variedad de otros factores que incluyen, pero no se limitan a, factores demográficos, ambientales, de empleo, genéticos e historia médica. Ciertas signos, síntomas característicos y factores relacionados se pueden cuantificar a través de una variedad de métodos para producir importante información diagnóstica.

25 El término “sarcoma” se refiere a un tumor maligno de un tejido que conecta, soporta, o rodea otras estructuras y órganos del cuerpo. En una modalidad, un sarcoma es un tipo de sarcoma de los “tumores de la familia de Ewing.”

30 Como se utiliza aquí, el término “tumores de la familia de Ewing” se utiliza de forma intercambiable con el término “EFT” y se refiere a un grupo de cánceres que afectan los tejidos óseos y blandos cercanos. El término “tumores de la familia de Ewing” como se utiliza aquí incluye tumor de Ewing de los huesos (también
35 llamado sarcoma de Ewing), el tipo más común de EFT, Ewing Extraóseo (EOE), un tumor que crece en los tejidos blandos fuera del hueso, y tumor neuroectodérmico primitivo periférico (PPNET), un cáncer encontrado en los

huesos y tejidos blandos, que incluyen tumor de Askin, que es un PPNET de la pared torácica.

El término “expresión” se utiliza aquí para significar el proceso mediante el cual un polipéptido se produce a partir de ADN. El proceso involucra la transcripción del gen en mRNA y la traducción de este mRNA en un polipéptido. Dependiendo del contexto en el que se utiliza, “expresión” se puede referir a la producción de ARN, proteína o ambos.

Los términos “nivel de expresión de un gen en una célula” o “expresión de nivel de gen” se refiere a el nivel de mRNA, así como también transcripciones nacientes de pre-mRNA, transcripción que procesa intermedios, mRNA(s) maduros y productos de degradación, codificados por el gen en la célula.

El término “modulación” se refiere a regulación ascendente (es decir, activación o estimulación), regulación descendente (es decir, inhibición o supresión) de una respuesta, o los dos en combinación o a parte. Un “modulador” es un compuesto o molécula que modula, y puede ser, por ejemplo, un agonista, antagonista, activador, estimulador, supresor, o inhibidor.

Un “alto nivel de expresión”, “alto nivel de actividad”, “nivel incrementado de expresión” o “nivel incrementado de actividad” se refiere a un nivel de expresión y/o actividad en una muestra de prueba que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión y/o actividad, y es preferiblemente por lo menos dos veces, y más preferiblemente tres, cuatro, cinco o diez o más veces el nivel de expresión y/o actividad del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto no saludable no afligido con sarcoma) y preferiblemente, el nivel de expresión y/o actividad promedio del marcador en varias muestras de control.

Un “bajo nivel de expresión”, “bajo nivel de actividad”, “nivel reducido de expresión” o “nivel reducido de actividad” se refiere a un nivel de expresión y/o actividad en una muestra de prueba que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión y/o actividad, pero es preferiblemente por lo menos dos veces, y más preferiblemente tres, cuatro, cinco o diez o más veces menos del nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra que se ha calibrado directamente o indirectamente contra un panel de sarcomas con información de seguimiento que sirve como un estándar

de validación para pronosticar la capacidad del marcador) y preferiblemente, el nivel de expresión y/o actividad promedio del marcador en varias muestras de control.

- 5 Como se utiliza aquí, "anticuerpo" incluye, por vía de ejemplo, formas de
ocurrencia natural de anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos
recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos
y humanizados y anticuerpos multi-específicos, así como también fragmentos y
derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen por lo
10 menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpo pueden
comprender una proteína o grupo funcional químico conjugado a un anticuerpo.

- Como se utiliza aquí, "estándar conocido" o "control" se refiere a una o más
de una cantidad y/o relación matemática, cuando sea aplicable, con respecto a un
15 marcador de la invención, y la presencia o ausencia de sarcoma. Un estándar
conocido preferiblemente refleja tal cantidad y/o relación matemática característica
de un tumor recurrente y un no tumor recurrente y/o un tumor agresivo o no
agresivo. Los reactivos para generar un estándar conocido incluye, sin limitación,
células de tumor de un tumor conocido por ser agresivo, células de tumor de un
20 tumor conocido por ser no agresivo, y opcionalmente anticuerpos etiquetados. Los
estándares conocidos también pueden incluir estirpes celulares de cultivo de tejido
(que incluyen, pero no se limitan a, estirpes celulares que se han manipulado para
expresar proteínas de marcador específico o no expresan proteínas de
marcadores específicos, o xenoinjertos de tumor que contienen constitutivamente
25 cantidades constantes de proteína marcadora, o se puede manipular (por ejemplo,
mediante exposición a ambiente cambiado, donde tal ambiente cambiado puede
incluir pero no limitarse a factores de crecimiento, hormonas, esteroides, citocinas,
anticuerpos, varios fármacos y anti-metabolitos, y matrices celulares) para
expresar una proteína marcadora. Las estirpes celulares se pueden montar
30 directamente sobre portaobjetos para análisis, se fijan, se embeben en parafina
directamente como un sedimento, o se suspende en una matriz tal como agarosa,
luego se fijan, se embeben en parafina, se seccionan y se procesan como
muestras de tejido. Los estándares se deben calibrar directamente o
indirectamente contra un panel de sarcomas con información de seguimiento que
35 sirve como un estándar de validación para pronosticar la capacidad de las
proteínas marcadoras.

“Tratamiento primario” como se utiliza aquí, se refiere al tratamiento inicial de un sujeto afligido con sarcoma. Los tratamientos primarios incluyen, sin limitación, cirugía, radiación, terapia hormonal, quimioterapia, inmunoterapia, terapia angiogénica, terapia con citoblasto alogénico, y terapia a través de moduladores.

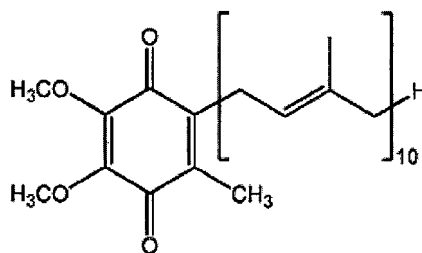
Un sarcoma se “trata” si por lo menos se espera que un síntoma del sarcoma se alivie, termine, disminuya, o prevenga. Como se utiliza aquí, sarcoma también se “trata” si la recurrencia o metástasis del sarcoma se reduce, disminuye, retrasa, o previene.

Un equipo es cualquier manufactura (por ejemplo un empaque o contenedor) que comprende por lo menos un reactivo, por ejemplo una sonda, para detectar específicamente un marcador de la invención, la manufactura se promueve, distribuye o vende como una unidad para desarrollar los métodos de la presente invención.

El término “Trolamina,” como se utiliza aquí, se refiere a Trolamina NF, Trietanolamina, TEAlan®, TEAlan 99%, Trietanolamina, 99%, Trietanolamina, NF o Trietanolamina, 99%, NF. Estos términos se pueden utilizar de forma intercambiable aquí.

Una “molécula de Coenzima Q10” o “molécula CoQ10”, como se utiliza aquí, incluye Coenzima Q10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima.

La CoQ10 tiene la siguiente estructura:



Una “unidad estructural” de CoQ10 incluye, pero no se limita a, fenilalanina, tirosina, 4-hidroxifenilpiruvato, fenilacetato, 3-metoxi-4-hidroximandelato, ácido vanílico, 4-hidroxibenzoato, ácido mevalónico, farnesilo, 2,3-dimetoxi-5-metil-p-

benzoquinona, así como también los ácidos o iones correspondientes de los mismos.

Un "derivado de CoQ10" es un compuesto que tiene una estructura similar a CoQ10 excepto que se reemplaza un átomo o grupo funcional con otro átomo o grupo de átomos. Un "análogo de CoQ10" incluye análogos que no tienen o por lo menos tienen uno (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o nueve) repeticiones de isoprenilo.

El término "intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima" como se utiliza aquí, caracteriza aquellos compuestos que se forman entre la conversión química/biológica de la tirosina y el Acetil-CoA a ubiquinona. Los intermedios de la ruta de biosíntesis de la coenzima incluyen 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoato, 3-hexaprenil-4,5-dihidroxibenzoato, 3-hexaprenil-4-hidroxi-5-metoxibenzoato, 2-hexaprenil-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-hexaprenil-3-metil-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-hexaprenil-3-metil-5-hidroxi-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 3-Octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2-octaprenil-6-metoxifenol, 2-octaprenil-3-metil-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-5-hidroxi-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-decaprenil-3-metil-5-hidroxi-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-decaprenil-3-metil-6-metoxi- 1,4-benzoquinona, 2-decaprenil-6-metoxifenol, 3-decaprenil-4-hidroxi-5-metoxibenzoato, 3-decaprenil-4,5-dihidroxibenzoato, 3-decaprenil-4-hidroxibenzoato, 4-hidroxi fenilpiruvato, 4-hidroxifenilactato, 4-hidroxi-benzoato, 4-hidroxicinamato y hexaprenidifosfato.

En ciertas modalidades, el intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima comprende: (a) benzoquinona o por lo menos una molécula que facilita la biosíntesis del anillo de benzoquinona, y (b) por lo menos una molécula que facilita la síntesis de y/o adhesión de unidades de isoprenoide al anillo de benzoquinona. En otras modalidades, dicha por lo menos una molécula que facilita la biosíntesis del anillo de benzoquinona comprende: L-Fenilalanina, DL-Fenilalanina, D-Fenilalanina, L-Tirosina, DL-Tirosina, D-Tirosina, 4-hidroxi-fenilpiruvato, 3-metoxi-4-hidroximandelato (vanililmandelato o VMA), ácido vanílico, piridoxina, o pantenol. En otras modalidades, dicha por lo menos una molécula que facilita la síntesis de y/o adhesión de unidades de isoprenoide al anillo de benzoquinona comprende: fenilacetato, 4-hidroxi-benzoato, ácido mevalónico, acetilglicina, acetil-CoA, o farnesilo. En otras modalidades, el intermedio comprende: (a) una o más de L-Fenilalanina, L-Tirosina, y 4-

hidroxifenilpiruvato; y, (b) uno o más de 4-hidroxi benzoato, fenilacetato, y benzoquinona. En otras modalidades, el intermedio: (a) inhibe expresión Bcl-2 y/o promueve expresión de Caspasa -3; y/o, (b) inhibe proliferación celular.

5 En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, los MIM o cambiadores epi descritos aquí, por ejemplo, las moléculas de Coenzima Q10 de la invención, comparten una actividad común con la Coenzima Q10. Como se utiliza aquí, la frase "comparten una actividad común con la Coenzima Q10" se refiere a la capacidad de un compuesto para exhibir por lo
10 menos una porción de la misma o similar actividad como Coenzima Q10. En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención exhiben 25% o más de la actividad de Coenzima Q10. En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención exhiben hasta y incluyendo aproximadamente 130% de la actividad de Coenzima Q10. En algunas modalidades, los compuestos de la
15 presente invención exhiben aproximadamente 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
20 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, 116%, 117%, 118%, 119%, 120%, 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 126%, 127%, 128%, 129%, o 130% de la actividad de Coenzima Q10. Se debe entender que cada uno de los valores enumerados en este párrafo se puede modificar por
25 el término "aproximadamente". Adicionalmente, se debe entender que cualquier rango que se defina por cualesquier dos valores listados en este párrafo significa que se abarca por la presente invención. Por ejemplo, en algunas modalidades, los compuestos de la presente invención exhiben entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100% de la actividad de Coenzima Q10. En algunas
30 modalidades, la actividad compartida por la Coenzima Q10 y los compuestos de la presente invención es la capacidad para inducir un cambio en el metabolismo celular. En ciertas modalidades, la actividad compartida por la CoQ10 y los compuestos de la presente invención se mide mediante OCR (Índice de Consumo de Oxígeno) y/o ECAR (Índice de Acidificación Extracelular). En ciertas
35 modalidades, la actividad compartida por la CoQ10 y los compuestos de la presente invención es la capacidad para inhibir el crecimiento de una célula de sarcoma. En ciertas modalidades, la actividad compartida por la CoQ10 y los compuestos de la presente invención es la capacidad para inducir expresión global

de las proteínas del citoesqueleto. En ciertas modalidades, la actividad compartida por la CoQ10 y los compuestos de la presente invención es la capacidad para desestabilizar la arquitectura estructural de un cáncer, por ejemplo, sarcoma, célula.

5

Se hará referencia ahora en detalle a las modalidades preferidas de la invención. Aunque la invención se describirá en conjunto con las modalidades preferidas, se entenderá que no está destinada a limitar la invención a aquellas modalidades preferidas. Por el contrario, está destinada a cubrir alternativas, modificaciones, y equivalentes que se puedan incluir dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

10

II. Influenciadores de entorno

15

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sarcoma mediante la administración de un influenciador de Entorno. "Influenciadores de entorno" (influenciadores Env) son moléculas que influyen o modulan el entorno de la enfermedad de un humano en una forma benéfica permitiendo que el entorno de la enfermedad del humano cambie, o se vuelva a restablecer o mantenga un entorno normal o saludable que lleve a un estado normal. Los influenciadores Env incluyen Moléculas Intracelulares Multidimensionales (MIMs) e cambiadores epimetabólicos (cambiadores Epi) como se define adelante. Los influenciadores Env, MIMs e cambiadores Epi se describen e más detalle en la Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 12778,094, Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 12/777,902, Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 12/778,029, Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 12/778,054, y Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 12/778,010, los contenidos de cada una se incorporan aquí como referencia.

20

25

30

1. Molécula Intracelular Multidimensional (MIM)

35

El término "Molécula Intracelular Multidimensional (MIM)", es una versión aislada o versión producida sintéticamente de una molécula endógena que es producida naturalmente por el cuerpo y/o está presente en por lo menos una célula de un humano. Un MIM es capaz de entrar en una célula y la entrada en la célula incluye entrada parcial o completa en la célula siempre que la porción biológicamente activa de la molécula entre completamente en la célula. Las MIM

don capaces de inducir una transducción de señal y/o mecanismo de expresión de gen dentro de la célula. Las MIM son multidimensionales porque tiene un terapéutico y un portador, por ejemplo, suministro de fármaco, efecto. Las MIM también son multidimensionales porque las moléculas actúan en una forma en el estado de la enfermedad y en una forma diferente en un estado normal. Por ejemplo, en el caso de CoQ- 10, la administración de CoQ- 10 a una célula de melanoma en la presencia de VEGF lleva a un nivel reducido de Bcl2 que, a su vez, lleva a un potencial oncogénico reducido para la célula de melanoma. En contraste, en un fibroblasto normal, la co-administración de CoQ- 10 y VEGF no tiene efecto sobre los niveles de Bcl2.

En una modalidad, una MIM también es un cambiador epi. En otra modalidad, un MEVI no es un cambiador epi. En otra modalidad, una MIM se caracteriza por una o más de las anteriores funciones. En otra modalidad, una MIM se caracteriza por dos o más de las anteriores funciones. En una modalidad adicional, una MIM se caracteriza por tres o más de las anteriores funciones. En todavía otra modalidad, una MIM se caracteriza por todas las anteriores funciones. El técnico experto apreciará que un MEVI de la invención también está destinado a abarcar una mezcla de dos o más moléculas endógenas, en donde la mezcla se caracteriza por una o más de las anteriores funciones. Las moléculas endógenas en la mezcla están presentes en una relación de tal manera que la mezcla funciona como una MIM.

Los MEVI pueden ser moléculas basadas en lípidos o sin lípidos.. Ejemplos de MEVIs incluyen, pero no se limitan a, CoQ10, acetil Co- A, palmitil Co- A, L-carnitina, aminoácidos tal como, por ejemplo, tirosina, fenilalanina, y cisteína. En una modalidad, la MIM es una molécula pequeña. En una modalidad de la invención, la MIM no es CoQ10. Los MEVI pueden ser identificados de forma rutinaria por un experto en la técnica utilizando cualquiera de los ensayos descritos en detalle aquí.

(i) Métodos para identificar MIMS

La presente invención proporciona métodos para identificar una MIM. Los métodos para identificar una MIM o implican, generalmente, la adición exógena a una célula de una molécula endógena y evaluar el efecto sobre la célula, por ejemplo, el perfil de microentorno celular, que proporciona la molécula endógena. Los efectos sobre la célula se evalúan en uno o más de los niveles de mRNA,

proteína, lípido, y/o metabolito celulares para identificar alteraciones en el perfil de microentorno celular. En una modalidad, las células son células cultivadas, por ejemplo, in vitro. En una modalidad, las células están presentes en un organismo. La molécula endógena se puede agregar a la célula en una concentración simple o se puede agregar a la célula sobre un rango de concentraciones. En una modalidad, la molécula endógena se agrega a las células de tal manera que se eleva el nivel de la molécula endógena en las células (por ejemplo, se eleva en 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2.0 veces, 3.0 veces, 4.0 veces, 5.0 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más) cuando se compara con el nivel de la molécula endógena en un control, célula no tratada.

Las moléculas que inducen un cambio en la célula cuando se detecta por alteraciones in, por ejemplo, se puede evaluar adicionalmente una cualquiera o más de morfología fisiología, y/o composición (por ejemplo, mRNA, proteína, lípido, metabolito) para determinar si los cambios inducidos en el perfil de microentorno celular son diferentes entre un estado celular de enfermedad y un estado celular normal. Las células (por ejemplo, estirpes celulares cultivadas) de diverso origen de tejido, tipo celular, o estado de enfermedad se puede evaluar para evaluación comparativa. Por ejemplo, los cambios inducidos en el perfil de microentorno celular de una célula neoplásica se pueden comparar con los cambios inducidos en una célula no neoplásica o normal. Se observa una molécula endógena que induce un cambio en el perfil de microentorno de una célula (por ejemplo, induce un cambio en la morfología fisiología y/o composición, por ejemplo, mRNA, proteína, lípido o metabolito, de la célula) y/o induce diferencialmente (por ejemplo, preferencialmente) un cambio en el perfil de microentorno de una célula enferma cuando se compara con una célula normal, se identifica como una MIM.

Las MIM de la invención pueden ser MMI basadas en lípido o MMI basadas en no lípido. Los métodos para identificar MIM basada en lípido implican los métodos basados en célula descritos anteriormente en los que una molécula endógena basada en lípido se agrega exógenamente a la célula. En una modalidad preferida, la molécula endógena basada en lípido se agrega a la célula de tal manera que se eleva el nivel de la molécula endógena basada en lípido en la célula. En una modalidad, el nivel de la molécula endógena basada en lípido se eleva en 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7

veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2.0 veces, 3.0 veces, 4.0 veces, 5.0 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más cuando se compara con el nivel en una célula de control no tratada.

5 La formulación y suministro de la molécula basada en lípido a la célula depende de las propiedades de cada molécula probada, pero muchos métodos se conocen en la técnica. Ejemplos de formulación y suministro de moléculas basada en lípido incluyen, pero no se limita a, solubilización mediante co-disolventes, moléculas portadoras, liposomas, dispersiones, suspensiones, dispersiones de
10 nanopartícula, emulsiones, por ejemplo, emulsiones aceite en agua o agua en aceite, emulsiones multifase, por ejemplo, emulsiones aceite en agua en aceite, atropamiento y encapsulación de polímero. El suministro de la MIM basada en lípido a la célula se puede confirmar mediante la extracción de los lípidos celulares y la cuantificación de la MIM mediante métodos de rutina conocidos en la técnica,
15 tal como espectrometría de masa.

Los métodos para identificar los MIM basados en no lípidos involucran los métodos basados en célula descritos anteriormente en los que una molécula endógena basada en no lípido se agrega exógenamente a la célula. En una
20 modalidad preferida, la molécula endógena basada en no lípido se agrega a la célula de tal manera que se eleva el nivel de la molécula endógena basada en no lípido en la célula. En una modalidad, el nivel de la molécula endógena basada en no lípido se eleva en 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2.0 veces, 3.0 veces, 4.0 veces, 5.0 veces,
25 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más cuando se compara con el nivel en una célula de control no tratada. La formulación y suministro de la molécula no basada en lípido a la célula depende de las propiedades de cada molécula probada, pero se conocen muchos métodos en la técnica. Ejemplos de formulaciones y modos de suministro de
30 molécula no basada en lípidos incluyen, pero no se limitan a, solubilización mediante co-disolventes, moléculas portadoras, transporte activo, atropamiento o adsorción de polímero o, injerto de polímero, encapsulación liposómica, y formulación con sistemas de suministro objetivados. El suministro de las MIM basadas en no lípidos a la célula se puede confirmar mediante extracción del
35 contenido celular y cuantificación de la MIM mediante métodos de rutina conocidos en la técnica, tal como espectrometría de masa.

2. Cambiadores Epimetabólicos (cambiadores Epi)

Como se utiliza aquí, un “cambiador epimetabólico” (cambiador epi) es una molécula que modula el cambio metabólico de un estado saludable a(o normal) a un estado de enfermedad y viceversa, manteniendo o reestableciendo por lo tanto la salud celular, de tejido, órgano, sistema en un humano. Los cambiadores Epi son capaces de efectuar normalización en un microentorno de tejido. Por ejemplo, un cambiador epi incluye cualquier molécula que es capaz, cuando se agrega a o agota de una célula, afectar el microentorno (por ejemplo, el estado metabólico) de una célula. El técnico experto apreciará que un cambiador epi de la invención también está destinado a abarcar una mezcla de dos o más moléculas, en donde la mezcla se caracteriza por una o más de las anteriores funciones. Las moléculas en la mezcla están presentes en una relación tal que la mezcla funciona como un cambiador epi. Ejemplos de cambiadores epi incluyen, pero no se limitan a, CoQ-10; vitamina D3; componentes ECM tales como fibronectina; inmunomoduladores, tales como TNFa o cualquiera de las interleuquinas, por ejemplo, IL-5, IL-12, IL-23; factores angiogénicos; y factores apoptóticos.

En una modalidad, el cambiador epi es también una MIM. En una modalidad, el cambiador epi no es CoQ10. los cambiadores Epi se pueden identificar de forma rutinaria por un experto en la técnica utilizando cualquiera de los ensayos descritos en detalle aquí.

(i) Métodos para identificar cambiadores Epi

Los cambiadores epimetabólicos (cambiador epi) son moléculas capaces de modular el estado metabólico de una célula, por ejemplo, induciendo un cambio metabólico desde un estado saludable (o normal) a un estado de enfermedad y viceversa, y son capaces por lo tanto de mantener o reestablecer la salud celular, de tejido, órgano, sistema y/o anfitrión en un humano. Los cambiadores Epi de la invención tienen así utilizada en la evaluación diagnóstica de un estado de enfermedad. Los cambiadores Epi de la invención tienen utilidad adicional en aplicaciones terapéuticas, en donde la aplicación o administración del cambiador epi (o modulación del cambiador epi mediante otras moléculas terapéuticas) efectúa una a normalización en un tejido microentorno y el estado de enfermedad.

La identificación de un cambiador epimetabólico implica, generalmente, establecer un perfil, por ejemplo, de metabolitos, lípidos, proteínas o ARNs (como perfiles individuales o en combinación), para un panel de células o tejidos que

exhiben estados de enfermedad diferenciales, progresión, o agresividad. Una molécula de los perfiles para los que un cambio en el nivel (por ejemplo, un nivel incrementado o reducido) se correlaciona con el estado de enfermedad, progresión o agresividad se identifica como un cambiador epi potencial.

5

En una modalidad, un cambiador epi es también una MIM. Los cambiadores epi potenciales se pueden evaluar por su capacidad de introducir células luego de adición exógena a una célula al utilizar cualquier número de técnicas de rutina conocidas en el arte, y al utilizar cualquiera de los métodos descritos aquí. Por ejemplo, entrada de los cambiadores epi potenciales en una célula se puede confirmar mediante la extracción del contenido celular y cuantificación del cambiador epi potencial mediante métodos de rutina conocidos en la técnica, tal como espectrometría de masa. Un cambiador epi potencial que es capaz de ingresar en una célula por lo tanto se identifica como una MIM.

15

Para identificar un cambiador epi, un cambiador epi potencial se evalúa luego para la capacidad de cambiar el estado metabólico de una célula. La capacidad de un cambiador epi potencial para cambiar el estado metabólico del microentorno celular se evalúa al introducir (por ejemplo, agregar de forma exógena) a una célula un cambiador epi potencial y monitorear en la célula uno o más de: cambios en la expresión de gen (por ejemplo, cambios en mRNA o proteína expresión), cambios de concentración en niveles de lípido o metabolito, cambios en niveles de molécula bioenergética, cambios en energéticos celulares, y/o cambios en la función o número mitocondrial. Los cambiadores epi potenciales capaces de cambiar el estado metabólico del microentorno celular se pueden identificar de forma rutinaria por un experto en la técnica utilizando cualquiera de los ensayos descritos en detalle aquí. Los cambiadores epi potenciales se evalúan adicionalmente para la capacidad de cambiar el estado metabólico de una célula enferma hacia un estado saludable normal (o a la inversa, para la capacidad de cambiar el estado metabólico de una célula normal hacia un estado de enfermedad). Un cambiador epi potencial capaz de cambiar el estado metabólico de una célula enferma hacia un estado saludable normal (o cambiar el estado metabólico de célula normal saludable hacia un estado de enfermedad) se identifica así como un cambiador epi. En una modalidad preferida, el cambiador epi no impacta de forma negativa la salud y/o el crecimiento de células normales.

35

Los cambiadores epimetabólicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, metabolitos de molécula pequeña, moléculas basadas en lípidos, y

proteínas y ARNs. Para identificar un cambiador epimetabólico en la clase de metabolitos endógenos de molécula pequeña, se establecen perfiles de metabolito para un panel de células o tejidos que exhiben estados diferenciales de enfermedad, progresión, o agresividad. El perfil de metabolito para cada célula o tejido se determina al extraer metabolitos de la célula o tejido y luego identificar y cuantificar los metabolitos utilizando métodos de rutina conocidos por el técnico experto, que incluyen, por ejemplo, métodos de espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida o espectrometría de masa acoplada a cromatografía de gas. Los metabolitos para los que un cambio en el nivel (por ejemplo, un nivel incrementado o reducido) se correlaciona con el estado de enfermedad, progresión o agresividad, se identifican como cambiadores epi potenciales.

Para identificar los cambiadores epimetabólicos en la clase de moléculas endógenas basadas en lípidos, se establecen los perfiles de lípido para un panel de células o tejidos que exhiben estados diferenciales de enfermedad, progresión, o agresividad. El perfil de lípido para cada célula o tejido se determina al utilizar métodos de extracción de lípido, seguidos por la identificación y cuantificación de los lípidos utilizando métodos de rutina conocidos por el técnico experto, que incluyen, por ejemplo, métodos de espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida o espectrometría de masa acoplada a cromatografía de gas. Los lípidos para los que un cambio en el nivel (por ejemplo, un incremento o reducción en la masa o nivel de traza) se correlaciona con el estado de enfermedad, progresión o agresividad, se identifican como cambiadores epi potenciales.

Para identificar cambiadores epimetabólicos en la clase de proteínas y ARNs, se establecen los perfiles de expresión de gen para un panel de células o tejidos que exhiben estados diferenciales de enfermedad, progresión, o agresividad. El perfil de expresión para cada célula o tejido se determina en los niveles de mRNA y/o proteína utilizando métodos proteómicos estándar, matriz de mRNA, o matriz genómica, por ejemplo, como se describe en detalle aquí. Los genes para los que un cambio en expresión (por ejemplo, un incremento o reducción en la expresión en el nivel de mRNA o proteína) se correlaciona con el estado de enfermedad, progresión o agresividad, se identifican como cambiadores epi potenciales.

Una vez se establecen los perfiles moleculares descritos anteriormente (por ejemplo, para metabolitos solubles, moléculas basadas en lípidos, proteínas, ARN,

u otras clases biológicas de la composición), el análisis de la ruta celular y bioquímica se lleva a cabo para dilucidar los enlaces conocidos entre los cambiadores epi potenciales identificados en el entorno celular. Esta información obtenida por el análisis de ruta celular y/o bioquímica se puede utilizar para categorizar las rutas y los cambiadores epi potenciales.

La utilidad de un cambiador epi para modular un estado de enfermedad se puede evaluar adicionalmente y confirmar por un experto en la técnica utilizando cualquier número de ensayos conocidos en la técnica o descritos en detalle aquí.

La utilidad de un cambiador epi para modular un estado de enfermedad se puede evaluar mediante suministro exógeno directo del cambiador epi a una célula o a un organismo. La utilidad de un cambiador epi para modular un estado de enfermedad se puede evaluar alternativamente mediante el desarrollo de moléculas que modulan directamente el cambiador epi (por ejemplo, el nivel o actividad del cambiador epi). La utilidad de un cambiador epi para modular un estado de enfermedad también se puede evaluar mediante el desarrollo de moléculas que modulan indirectamente el cambiador epi (*por ejemplo*, el nivel o actividad del cambiador epi) al regular otras moléculas, tales como genes (por ejemplo, regulados en el nivel de ARN o proteína), colocados en la misma ruta como el cambiador epi.

El método Epimetabolomic descrito aquí facilita la identificación de las moléculas endógenas que existen en un microentorno celular y cuyos niveles son detectados y controlados a través de genética, mRNA, o mecanismos a base de proteínas. Las rutas de regulación de respuesta se encuentran en las células normales que son accionadas por un cambiador Epi de la invención pueden proporcionar un valor terapéutico en un entorno celular mal emparejado o enfermo. Adicionalmente, el método epimetabólico descrito aquí identifica cambiadores epi que pueden proporcionar una indicación de uso para uso en la selección de pacientes clínicos, un kit de diagnóstico de la enfermedad, o como un indicador pronóstico.

III. Ensayos útiles para identificar MIMs/cambiadores Epi

Las técnicas y métodos de la presente invención empleadas para separar e identificar moléculas y compuestos de interés incluyen pero no se limitan a: cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectroscopía de masas (MS), cromatografía de gases (GC), cromatografía

líquida/ espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN), formación de imagen de resonancia magnética (MRI), Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se entiende adicionalmente que las técnicas de espectrometría de masas incluyen, pero no se limitan a, el uso de instrumentos centrados dobles del sector magnético, instrumentos cuadrupolo de transmisión, instrumentos cuadrupolo de trampa de iones, instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), instrumentos de resonancia de iones de ciclotrón de transformada de Fourier (FT-MS) y espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y deserción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS).

Cuantificación de niveles de molécula bioenergética:

Se pueden identificar los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) por los cambios en niveles de molécula bioenergética celular (por ejemplo, ATP, piruvato, ADP, NADH, NAD, NADPH, NADP, acetilCoA, FADH₂) de células para las cuales se ha aplicado un cambiador epi candidato. Los ensayos de ejemplo de niveles de molécula bioenergética utilizan métodos basados en colorimetría, fluorescencia, y/o bioluminiscencia. Ejemplos de tales ensayos se proporcionan adelante.

Los niveles de ATP en las células se pueden medir con un número de ensayos y sistemas conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un sistema, el ATP citoplásmico liberado de las células lisadas reacciona con luciferina y la enzima luciferasa para producir luz. Esta bioluminiscencia se mide por un bioluminometro y se puede calcular la concentración de ATP intracelular de las células lisadas (EnzyLight™ Equipo de ensayo de ATP (EATP-100), BioAssay Systems, Hayward, CA). En otro sistema, por ejemplo, el ATP y su forma desfosforilada, ADP, se calculan a través de bioluminiscencia, después se calculan los niveles de ATP, el ADP se transforma en ATP y luego se detectan y se calcula utilizando el mismo sistema de luciferasa (ApoSENSOR™ ADP / ATP Ratio Assay Kit, Bio Vision Inc., Mountain View, CA).

El piruvato es un intermedio importante en la ruta metabólica celular. El piruvato se puede convertir en carbohidratos a través de la gluconeogenia, convertida en ácido graso o se metaboliza a través de acetil-CoA, o se convierte en alanina o etanol, dependiendo del estado metabólico de una célula. Por lo tanto

la detección de los niveles de piruvato proporciona una medida de la actividad y el estado metabólico de una muestra de células. Un ensayo para detectar piruvato, por ejemplo, utiliza tanto un colorimétrico y fluorométrico para detectar concentraciones de piruvato dentro de diferentes rangos (EnzyChrom™ equipo de

5 Ensayo de piruvato (Cat. # EPYR-100), BioAssay Systems, Hayward, CA).

Los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) pueden influir en el proceso de fosforilación oxidativa llevado a cabo por las mitocondrias en las células, que están involucrados en la generación y

10 mantenimiento de las moléculas bioenergéticos en las células. Adicionalmente para ensayos que detecten cambios en la energética celular en cultivos de células y directamente en muestras (descrito más adelante), existen ensayos que detectan y cuantifican los efectos de los compuestos de enzimas discretos y complejos de mitocondrias en las células. Por ejemplo, el Ensayo de Actividad

15 OXPHOS Completo MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, OR) puede detectar y cuantificar los efectos de los compuestos que se aplican directamente a los complejos I a V, extraídos de las mitocondrias. Los ensayos para la detección y cuantificación de los efectos individuales de los complejos mitocondriales, tales como NADH deshidrogenasa (complejo I), citocromo c oxidasa (Complejo IV) y la

20 ATP sintasa (complejo V) también están disponibles (MitoSciences Inc., Eugene, OR).

Medición de Energética Celular:

25 También se pueden identificar influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) mediante los cambios en la energética celular. Un ejemplo de la medición de la energética celulares son las medidas en tiempo real del consumo de oxígeno molecular y/o el cambio en el pH de los medios de un cultivo celular. Por ejemplo, la capacidad de un cambiador epi potencial para

30 modular el estado metabólico de una célula se puede analizar utilizando, por ejemplo, el analizador XF24 (Seahorse, Inc.). Esta tecnología permite la detección en tiempo real de los cambios de pH y oxígeno en una monocapa de células con el fin de evaluar la bioenergética de un microentorno celular. El analizador de XF24 mide y compara los índices de consumo de oxígeno (OCR), que es una

35 medida del metabolismo aeróbico, y la acidificación extracelular (ECAR), que es una medida de la glicólisis, ambos indicadores clave de la energéticas celulares.

Medición de la Fosforilación Oxidativa y la Función Mitocondrial

La fosforilación oxidativa es un proceso mediante el cual se genera ATP a través de la oxidación de compuestos nutrientes, llevado a cabo en eucariotas a través de los complejos de proteínas embebidas en las membranas de las mitocondrias. Como la principal fuente de ATP en las células de la mayoría de los organismos, los cambios en la actividad de fosforilación oxidativa pueden alterar fuertemente el metabolismo y el balance de energía dentro de una célula. En algunas modalidades, los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) se pueden detectar y/o identificar por sus efectos sobre la fosforilación oxidativa. En algunas modalidades, los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) se pueden detectar y/o identificar por sus efectos sobre los aspectos específicos de la fosforilación oxidativa, que incluyen, pero no se limitan a, la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP.

Los complejos de proteínas embebidos en membrana de la mitocondria que llevan a cabo procesos implicados en la fosforilación oxidativa realizan tareas específicas y se numeran I, II, III y IV. Estos complejos, junto con la la ATP sintasa de trans-membrana interna (también conocida como Complejo V), son las entidades clave implicadas en el proceso de fosforilación oxidativa. Adicionalmente a los ensayos que pueden examinar los efectos de los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) sobre la función mitocondrial en general y el proceso de fosforilación oxidativa en particular, están disponibles ensayos que se pueden utilizar para examinar los efectos de un cambiador epi sobre un complejo individual de forma separada de otros complejos

El Complejo I, también conocido como NADH-coenzima Q oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa, es la primera proteína de la cadena de transporte de electrones. En algunas modalidades, se puede desarrollar la detección y cuantificación del efecto de un cambiador epi sobre la producción de NAD + por Complejo I. Por ejemplo, el complejo se puede inmunocapturar a partir de una muestra en una placa de 96 pozos; la oxidación del NADH en NAD + tiene lugar simultáneamente con la reducción de una molécula de tinte que tiene una absorbancia incrementada a 450 nM (Equipo de Ensayo de Microplaca de Actividad de Enzima de Complejo I, MitoSciences Inc., Eugene, OR).

El Complejo IV, también conocido como citocromo c oxidasa (COX), es la última proteína en la cadena de transporte de electrones. En algunas

modalidades, se puede realizar la detección y cuantificación del efecto de un cambiador epi sobre la oxidación de citocromo c y la reducción de oxígeno al agua mediante Complejo IV. Por ejemplo, el COX se puede inmunocapturar en una microplaca y la oxidación del COX se mide con un ensayo colorimétrico (Equipo de Ensayo de Microplaca de Actividad de Enzima de Complejo Complejo IV, MitoSciences Inc., Eugene, OR).

La enzima final en el proceso de fosforilación oxidativa es la ATP sintasa (Complejo V), que utiliza el gradiente de protón creado por los otros complejos para energizar la síntesis de ATP a partir del ADP. En algunas modalidades, se puede realizar la detección y cuantificación del efecto de un cambiador epi sobre la actividad de la sintetasa de ATP. Por ejemplo, la actividad de la sintetasa de ATP y la cantidad de ATP sintasa en una muestra se puede medir por la ATP sintasa que se ha inmunocapturado en un pozo de una placa de micropozo. La enzima también puede funcionar como una ATPasa bajo ciertas condiciones, así en este ensayo para la actividad ATP sintasa, se mide el índice en el que se reduce el ATP a ADP al detectar la oxidación simultánea de NADH a NAD⁺. La cantidad de ATP se calcula utilizando un anticuerpo etiquetado con ATPasa (dúplex de ATP sintasa (Actividad + Cantidad) Equipo de Ensayo de Microplacas, MitoSciences Inc., Eugene, OR). Los ensayos adicionales para la fosforilación oxidativa incluyen ensayos que se prueban para efectos sobre la actividad de los Complejos II y III. Por ejemplo, el Sistema OXPHOS Completo MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, OR) se puede utilizar para evaluar los efectos de un compuesto sobre el Complejo II y III, así como también el Complejo I, IV y V, para proporcionar datos sobre los efectos de un compuesto en el sistema de fosforilación oxidativa completo.

Como se señaló anteriormente, se puede hacer la observación en tiempo real de las muestras de células intactas utilizando sondas para los cambios en el consumo de oxígeno y el pH en medios de cultivo celular. Estos ensayos de la energética de células proporcionan una amplia visión de la función mitocondrial y los efectos de los posibles influenciadores de entorno (por ejemplo, MeVis o cambiadores Epi) sobre la actividad de las mitocondrias en las células de la muestra.

Los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) también puede afectar a la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), un fenómeno en el que las membranas mitocondriales experimentan un aumento en

la permeabilidad debido a la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP). Un aumento de la permeabilidad mitocondrial puede conducir a la inflamación mitocondrial, una incapacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y la generación de ATP y la muerte celular. La MPT puede estar involucrada con la inducción de la apoptosis. (Véase, por ejemplo, Halestrap, AP, Biochem Soc Trans 34:232-237 (2006) y Lena, A. et al Diario de traslacional Med. 7: 13-26 (2009), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.)

En algunas modalidades, se miden la detección y cuantificación del efecto de un influenciador de entorno (por ejemplo, MIM o cambiadores Epi) sobre la formación, interrupción y/o efectos del MPT y MPTP. Por ejemplo, los ensayos pueden detectar MPT a través del uso de moléculas de tinte especializados (calceína) que se localizan dentro de las membranas internas de las mitocondrias y otros compartimientos citosólicos. La aplicación de otra molécula, CoCl₂, sirve para cancelar la fluorescencia del colorante calceína en el citosol. La CoCl₂ no puede tener acceso, sin embargo, el interior de la mitocondria, así la fluorescencia calceína en la mitocondria no se cancela a menos haya ocurrido MPT y la CoCl₂ puede acceder al interior de la mitocondria a través MPTPs. La pérdida de fluorescencia específica a mitocondria señala que ha ocurrido MPT. Se puede utilizar la citometría de flujo para evaluar la fluorescencia celular y de organelo (Equipo de Ensayo de Poro de Transición MitoProbe, Molecular Probes, Eugene, OR). Ensayos adicionales utilizan un microscopio de fluorescencia para la evaluación de los resultados experimentales (Equipo de Ensayo de Poro de Transición Mitocondrial Imagen-iT™ Lr E, Molecular Probes, Eugene, OR).

Medición de Proliferación Celular e Inflamación

En algunas modalidades de la invención, se pueden identificar los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) y evaluar por sus efectos sobre la producción o la actividad de las moléculas asociadas con la proliferación celular y/o inflamación. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, componentes de la matriz extracelular, quimiocinas, neuropéptidos, neurotransmisores, neurotrofinas y otras moléculas implicadas en la señalización celular, así como también moléculas intracelulares, tales como aquellas implicadas en la transducción de señal.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor de crecimiento, con potentes propiedades angiogénicas, vasculogénicas y

mitogénicas. El VEGF estimula la permeabilidad endotelial y la inflamación y la actividad del VEGF está implicada en numerosas enfermedades y trastornos, que incluyen artritis reumatoide, cáncer metastásico, degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética.

5

En algunas modalidades de la invención, un influenciador de entorno (por ejemplo, MEVI o cambiadores Epi) se puede identificar y caracterizar por sus efectos sobre la producción de VEGF. Por ejemplo, las células mantenidas en condiciones hipóxicas o en condiciones que imitaban la acidosis exhibirán producción de VEGA incrementada. El VEGF secretado en los medios se puede ensayar utilizando un ELISA u otros ensayos basados en anticuerpos, utilizando los anticuerpos anti-VEGF disponibles (R & D Systems, Minneapolis, MN). En algunas modalidades de la invención, un cambiador Epi se puede identificar y/o caracterizar con base en su efecto (s) sobre la respuesta de las células a VEGF y/o con base en su efecto (s) sobre la expresión o la actividad del receptor VEGF.

10
15

Implicado en la función del sistema inmune saludable, así como también en las enfermedades autoinmunes, el factor de necrosis tumoral (TNF) es un mediador clave de la inflamación y la activación del sistema inmune. En algunas modalidades de la invención, un cambiador Epi se puede identificar y caracterizar por sus efectos sobre la producción o la actividad del TNF. Por ejemplo, el TNF producido por células cultivadas y secretado en los medios se puede cuantificar a través de ELISA y otros ensayos basados en anticuerpos conocidos en la técnica. Adicionalmente, en algunas modalidades, un influenciador de entorno se puede identificar y caracterizar por su efecto (s) sobre la expresión de los receptores de TNF (Human TNF RI DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN).

20
25

Los componentes de la matriz extracelular (ECM) cumplen una función en la estructura de células y tejidos y en los procesos de señalización. Por ejemplo, las proteínas de unión del factor de crecimiento transformante beta latente son los componentes de ECM que crean un reservorio de factor de crecimiento transformante beta (TGFP) dentro de la ECM. El TGFP unido a matriz se puede liberar más tarde durante el proceso de remodelación de matriz y puede ejercer efectos del factor de crecimiento sobre las células cercanas (Dallas, S. Methods in Mol. Biol. 139:231-243 (2000)).

30
35

En algunas modalidades, un influenciador de entorno (por ejemplo, MIM o cambiador Epi) se puede identificar o caracterizar por su efecto (s) sobre la

creación de ECM por células cultivadas. Los investigadores han desarrollado técnicas con las que la creación de ECM mediante las células, así como también la composición de ECM, se pueden estudiar y cuantificar. Por ejemplo, se puede evaluar la síntesis de ECM mediante las células al embeber las células en un hidrogel antes de incubación. Los análisis bioquímicos y de otro tipo se realizan sobre el ECM generado por las células después de la cosecha celular y la digestión del hidrogel (Strehin, I. and Elisseeff, J. Methods in Mol. Bio. 522:349-362 (2009)).

En algunas modalidades, el efecto del influenciador de entorno (por ejemplo, MIM o cambiador Epi) sobre la producción, o situación de carencia de ECM o uno de sus componentes en un organismo se puede identificar o caracterizar. Se han desarrollado técnicas para la creación de ratones transgénicos condicionales (KO) que se permiten para inactivación de los genes ECM particulares sólo en tipos discretos de células o en ciertas etapas del desarrollo (Brancaccio, M. et al Methods in Mol Bio 522: 15-50. (2009)). Así se puede evaluar el efecto de la aplicación o administración de un cambiador epi o cambiador epi potencial sobre la actividad o la ausencia de un componente ECM particular en un tejido determinado o en una etapa particular del desarrollo.

Medición de la Integridad de la Membrana Plasmática y la Muerte Celular

Se pueden identificar los influenciadores de entorno (por ejemplo, MIMs o cambiadores Epi) mediante los cambios en la integridad de la membrana plasmática de una muestra de célula y/o mediante los cambios en el número o el porcentaje de células que experimentan apoptosis, necrosis o cambios celulares que demuestran una probabilidad de muerte celular incrementada o reducida.

Un ensayo para lactato deshidrogenasa (LDH) puede proporcionar una medición del estado y los niveles de daño celular. La LDH es una enzima citoplásmica estable y relativamente abundante. Cuando las membranas plasmáticas pierden la integridad física, la LDH se escapa al compartimiento extracelular. Las concentraciones más altas de LDH se correlacionan con niveles más altos de daño de la membrana plasmática y la muerte celular. Ejemplos de ensayos de LDH incluyen ensayos que utilizan un sistema colorimétrico para detectar y cuantificar los niveles de LDH en una muestra, en donde la forma reducida de una sal de tetrazolio se produce a través de la actividad de la enzima LDH (QuantiChrom™ Kit lactato deshidrogenasa (DLDH-100), BioAssay Systems,

Hayward, CA; LDH Equipo de Detección de Citotoxicidad, Clontech, Mountain View, CA).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que puede tener una variedad de diferentes eventos iniciadores. Un número de ensayos puede detectar cambios en el índice y/o número de células que experimentan apoptosis. Un tipo de ensayo que se utiliza para detectar y cuantificar la apoptosis es un ensayo capasa. Las capasas son cisteína proteasas específicas a ácido aspártico que se activan a través de la división proteolítica durante la apoptosis. Ejemplos de ensayos que detectan capasas activadas incluyen PhiPhiLux® (OncoImmunin, Inc., Gaithersburg, MD) y Sistemas de Ensayo Caspase-Glo® 3.7 (Promega Corp., Madison, WI). Ensayos adicionales que pueden detectar la apoptosis y los cambios en el porcentaje o el número de células que experimentan apoptosis en las muestras comparativas incluyen ensayos de fragmentación de TUNEL/ADN. Estos ensayos detectan las 180 a 200 pares base de los fragmentos de ADN generados por las nucleasas en la fase de ejecución de la apoptosis. Ensayos de fragmentación de TUNEL/ADN de ejemplo incluyen el Equipo de Detección de Muerte Celular In Situ (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) y los sistemas TUNEL colorimétricos y fluorométricos DeadEnd™ (Promega Corp., Madison, WI).

Algunos ensayos de apoptosis detectan y cuantifican las proteínas asociadas con una apoptosis y/o un estado no apoptótico. Por ejemplo, el Ensayo de Citotoxicidad Múltiple MultiTox-Fluor (Promega Corp., Madison, WI) utiliza un sustrato único, el sistema, fluorimétrico para detectar y cuantificar las proteasas específicas para vivir y las células muertas, proporcionando así una relación de células vivas a células que han experimentado apoptosis en una muestra de célula o tejido.

Los ensayos adicionales disponibles para detectar y cuantificar la apoptosis incluyen ensayos que detectan la permeabilidad celular (por ejemplo, APOPercentage™ Ensayo de APOPTOSIS, Biocolor, Reino Unido) y los ensayos para la Anexina V (por ejemplo, Equipo de Detección de Apoptosis con Biotina de Anexina V, Bio Vision Inc., Mountain View, CA).

IV. Tratamiento de un sarcoma

La presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir un sarcoma en un humano, que comprende administrar un influenciador de entorno,

por ejemplo, una MIM o cambiador EPI, por ejemplo, una molécula de CoQ10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) al humano en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el sarcoma, tratando o previniendo de este modo el sarcoma. En una modalidad preferida, los métodos para tratar o prevenir un sarcoma en un humano comprenden administrar una molécula de CoQ10 al humano en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el sarcoma, tratando o previniendo de este modo el sarcoma.

La presente invención también proporciona composiciones de una molécula de CoQ10 y métodos para preparar la misma. En una modalidad, la presente invención proporciona composiciones de CoQ10 y métodos para preparar las mismas. Preferiblemente, las composiciones comprenden por lo menos aproximadamente 1% a aproximadamente 25% de CoQ10 p/p. La CoQ10 se puede obtener de Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japón) como UBIDECARENONA (USP). La CoQ10 también se puede obtener de Kaneka Q10 como Kaneka Q10 (USP UBIDECARENONA) en forma de polvo (Pasadena, Texas, EE.UU.). La CoQ10 se utiliza en los métodos ejemplificados aquí que tienen las siguientes características: disolventes residuales que cumplen con los requerimientos USP 467; el contenido de agua es menor de 0.0%, menor de 0.05% o menor de 0.2%; el residuo en ignición es 0.0%, menor de 0.05%, o menor de 0.2%; el contenido de metal pesado es menor de 0.002%, o menor de 0.001%; la pureza de entre 98-100% o 99.9%, o 99.5%. Aquí se proporcionan métodos para preparar las composiciones.

Como se utiliza aquí, los términos o lenguaje "trastorno oncológico", "cáncer," "neoplasma," y "tumor," se utilizan de forma intercambiable y en ya sea la forma singular o plural, se refiere una célula que ha experimentado una transformación maligna que la hace patológica al organismo anfitrión. Las células neoplásicas principales (es decir, las células obtenidas de cerca del sitio de la transformación maligna) se pueden distinguir fácilmente de las células no neoplásicas mediante técnicas bien establecidas, particularmente examen histológico. La definición de una célula neoplásica, como se utiliza aquí, incluye no solo una célula de cáncer principal, pero también citoblastos neoplásicos, así como también células progenitoras neoplásicas o cualquier derivado celular de un antepasado de célula neoplásica. Esto incluye células neoplásicas con metástasis, y cultivos in vitro y estirpes celulares derivadas de células neoplásicas. Cuando se

hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es un que es detectable sobre la base del masa de tumor; por ejemplo, mediante procedimientos tales como escaneo CAT, formación de imagen MR, rayos X, ultrasonido o palpación, y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos a cáncer en una muestra que se puede obtener de un paciente.

El término "sarcoma" se refiere generalmente a un tumor que se compone de una sustancia similar al tejido conjuntivo embrionario y se compone generalmente de células estrechamente empaquetadas embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea. Ejemplos de los sarcomas que se pueden tratar con un influenciador de entorno de la invención incluyen, pero no se limitan a, tumores de la familia de Ewing (por ejemplo, sarcoma de Ewing (también conocido como tumor de Ewing de los huesos), Ewing extraóseo (EOE), y tumor neuroectodérmico primitivo periférico (TNEPp)), un condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma de tejido adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma de botrioide, el sarcoma de cloroma, corio carcinoma, sarcoma embrionario, el sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estrómico, sarcoma de Ewing, el sarcoma de la fascia, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico idiopático múltiple pigmentado, el sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T , el sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma de mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial, y sarcoma telangiectásico.

De acuerdo con lo anterior, en una modalidad, los métodos de tratamiento o prevención de la invención implican el tratamiento o prevención de un sarcoma seleccionado del grupo que consiste de sarcoma de Ewing, Ewing Extraóseo (EOE), tumor neuroectodérmico primitivo periférico (PPNET) y tumor de Askin. En una modalidad, el sarcoma es sarcoma de Ewing. En una modalidad, el sarcoma es EOE. En una modalidad, el sarcoma es PPNET. En una modalidad, el sarcoma es tumor de Askin.

En algunas modalidades, el sarcoma se caracteriza por una carencia de apoptosis. En otras modalidades, el sarcoma se caracteriza por angiogenia

incrementada. En otras modalidades, el sarcoma se caracteriza por degradación de la matriz extracelular (ECM). En todavía otras modalidades, el sarcoma se caracteriza por pérdida del control del ciclo celular. En aún otras modalidades, el sarcoma se caracteriza por un cambio en el gobierno metabólico de la fosforilación oxidativa de la mitocondria para incrementar la utilización y/o dependencia de lactato y flujo glicolítico. En modalidades adicionales, el sarcoma se caracteriza por mecanismos inmunomoduladores adaptados que tienen inmunovigilancia. En una modalidad, el sarcoma se caracteriza mediante por lo menos dos de los rasgos anteriores, por ejemplo, angiogenia incrementada y degradación de ECM.

En una modalidad, el sarcoma se caracteriza mediante por lo menos tres de los rasgos anteriores. En una modalidad, el sarcoma se caracteriza mediante por lo menos cuatro de los rasgos anteriores. En una modalidad, el sarcoma se caracteriza mediante por lo menos cinco de los rasgos anteriores. En una modalidad, el sarcoma se caracteriza por todos los seis rasgos anteriores.

De acuerdo con lo anterior, en algunas modalidades, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al restaurar la capacidad para la apoptosis o inducir apoptosis. En otras modalidades, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al reducir, disminuir o inhibir angiogenia. En aún otras modalidades, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al restaurar la matriz extracelular re-establecida. En otras modalidades, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al restaurar el control del ciclo celular. En aún otras modalidades, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al cambiar de nuevo la gobernabilidad del metabolismo de la glucólisis de fosforilación oxidativa mitocondrial. En modalidades adicionales, las moléculas de CoQ10 de la presente invención funcionan al restaurar inmunovigilancia o restaurar la estabilidad del cuerpo para reconocer la célula neoplásica como anteriormente.

Sin desear estar limitado por ninguna teoría particular, se considera que existe típicamente una cascada coordinada de eventos que se agregan al desarrollo del cáncer, por ejemplo, un sarcoma. Es decir, en algunas modalidades, cáncer, tal como un sarcoma no es individualmente dependiente de una causalidad de gen 1 de proteína 1. En algunas modalidades, cáncer, tal como un sarcoma, es un estado de enfermedad fisiológica que se manifiesta en cambios y alteraciones en el tejido que se convierten en tumores, los estados alterados de tejidos, por ejemplo, energética, integridad de matriz extracelular comprometida

que permite el potencial metastásico, la falta de inmunovigilancia y/o estado alterado de angiogenia.

Las células neoplásicas primarias, por ejemplo, células de sarcoma primarios (es decir, células obtenidas cerca del sitio de la transformación maligna) se puede distinguir fácilmente de las células no neoplásicas mediante técnicas bien establecidas, particularmente el examen histológico. La definición de una célula neoplásica, tal como se utiliza aquí, incluye no sólo una célula neoplásica primaria, sino también citoblastos neoplásicos, así como las células neoplásicas progenitoras o cualquier derivado celular de un antepasado de célula neoplásica. Esto incluye las células neoplásicas con metástasis, y cultivos in vitro y estirpes celulares derivadas de células neoplásicas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, una tumor "clínicamente detectable" es uno que es detectable sobre la base de la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos tales como escaneo CAT, formación de imagen RM, rayos X, ultrasonidos o palpación, y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra obtenible de un paciente.

En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, se pueden utilizar las moléculas de Coenzima Q10 de la invención, para tratar un sarcoma sensible a Coenzima Q10 en un sujeto en necesidad de este. La frase "sarcoma sensible a Coenzima Q10," o "sarcoma sensible a CoQ10," incluye sarcomas que se pueden tratar, prevenir o de otra forma aliviar mediante la administración de Coenzima Q10. Sin desear estar limitado por cualquier teoría particular, y como se describe adicionalmente aquí, se considera que CoQ10 funciona, por lo menos parcialmente, al inducir un cambio metabólico al microentorno de la célula, tal como un cambio hacia el tipo y/o nivel de fosforilación oxidativa en células en estado normal. De acuerdo con lo anterior, en algunas modalidades, los sarcomas sensibles a CoQ10 son sarcomas que surgen de un metabolismo alterado del microentorno celular. Lo sarcomas sensibles a Coenzima Q10 incluyen, por ejemplo, sarcomas, que, por ejemplo, se pueden segar hacia la glucólisis y biosíntesis de lactato.

En general, se puede utilizar una molécula de CoQ10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) para tratar profiláctica o terapéuticamente cualquier neoplasma. En una

modalidad, una molécula de CoQ10 se utiliza para tratar o prevenir un sarcoma. En una modalidad, una molécula de CoQ10 se utiliza para el tratamiento de tumores de la familia de Ewing. En una modalidad, el tumor de la familia de Ewing es sarcoma de Ewing.

5

La definición de una célula neoplásica, como se utiliza aquí, está destinada a incluir una célula neoplásica que produce energía mediante glucólisis anaeróbica (por ejemplo, glucólisis seguida por fermentación de ácido láctico en el citosol), glucólisis aeróbica (por ejemplo, glucólisis seguida por oxidación de piruvato en la

10 mitocondria), o una combinación de glucólisis anaeróbica y glucólisis aeróbica. En una modalidad, una célula neoplásica produce predominantemente energía mediante glucólisis anaeróbica (por ejemplo, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la energía de la célula se produce mediante glucólisis anaeróbica). En una modalidad, una célula neoplásica produce

15 predominantemente energía mediante glucólisis aeróbica (por ejemplo, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la energía de la célula se produce mediante glucólisis anaeróbica). La definición de células neoplásicas, como se utiliza aquí, también está destinada a incluir una población de células neoplásicas o mezcla de células neoplásicas que comprenden células que

20 producen energía mediante glucólisis anaeróbica y células que producen energía mediante glucólisis aeróbica. En una modalidad, una población de células neoplásicas comprende predominantemente células que producen energía mediante glucólisis anaeróbica (por ejemplo, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de las células en la población producen energía mediante

25 glucólisis anaeróbica). En una modalidad, una población de células neoplásicas comprende predominantemente células que producen energía mediante glucólisis aeróbica (por ejemplo, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de las células en la población).

30 Como se utiliza aquí, la frase "uso anaeróbico de glucosa" o "glucólisis anaeróbica" se refiere a una producción celular de energía mediante glucólisis seguida por fermentación de ácido láctico en el citosol. Por ejemplo, muchas células neoplásicas producen energía mediante glucólisis anaeróbica.

35 Como se utiliza aquí, la frase "glucólisis aeróbica" o "fosforilación oxidativa mitocondrial" se refiere a una producción celular de energía mediante glucólisis seguida por oxidación de piruvato en la mitocondria.

Como se utiliza aquí, la frase “capaz de bloquear el uso anaeróbico de glucosa y aumentar la fosforilación oxidativa mitocondrial” se refiere a la capacidad de un influenciador de entorno (por ejemplo, cambiador epimetabólico) para inducir un cambio o desplazamiento en el estado metabólico de una célula a partir de la glucólisis anaeróbica a la glucólisis aeróbica o fosforilación oxidativa mitocondrial.

En algunas modalidades de la invención, el sarcoma que se va a tratar no es un trastorno típicamente tratado a través de administración tópica con la expectativa de suministro sistémico y de un agente activo en niveles terapéuticamente efectivos. Como se utiliza aquí, la frase “un trastorno típicamente no tratado a través de administración tópica” se refiere a sarcomas que no se tratan en formas típicas o de rutina con un agente terapéutico a través de administración tópica pero en cambio se tratan típicamente con un agente terapéutico a través de, por ejemplo, administración intravenosa.

La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno oncológico agresivo en un humano, que comprende administrar una molécula de CoQ10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) al humano en una dosis baja seleccionada del régimen de dosificación utilizado o seleccionado de trastornos oncológicos no agresivos o menos agresivos, tratando o previniendo de este modo el trastorno oncológico agresivo. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno oncológico no agresivo en un humano, que comprende administrar un influenciador de entorno al humano en una dosis alta seleccionada sobre el régimen de dosificación utilizado o seleccionado para trastornos oncológicos agresivos, tratando o previniendo de este modo el trastorno oncológico no agresivo.

Como se utiliza aquí, el término “trastorno oncológico agresivo” se refiere a un trastorno oncológico que involucra tumor de crecimiento rápido. Un trastorno oncológico agresivo típicamente no responde o responde pobremente a tratamiento terapéutico.

Ejemplos de un trastorno oncológico agresivo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma pancreático, carcinoma hepatocelular, sarcoma de Ewing, cáncer de mama metastásico, melanoma metastásico, cáncer de cerebro (astrocitoma,

glioblastoma), cáncer neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer de próstata independiente de andrógeno, cáncer de ovario y linfoma no Hodgkin.

5 Como se utiliza aquí, el término "trastorno oncológico no agresivo" se refiere a un trastorno oncológico que involucra un tumor de crecimiento lento. Un trastorno oncológico no agresivo típicamente responde de forma favorable o moderada al tratamiento terapéutico. Ejemplos de un trastorno oncológico no agresivo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama no metastásico, cáncer
10 de próstata dependiente de andrógeno, carcinoma microcítico de pulmón y leucemia linfocítica aguda. En una modalidad, los trastornos oncológicos no agresivos incluyen cualquier trastorno oncológico que no es un trastorno oncológico agresivo.

15 La presente invención también proporciona un método para alterar la arquitectura del citoesqueleto de las células del sarcoma de un humano, que comprende seleccionar un sujeto humano que sufre de sarcoma, y administrar a dicho humano una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de Coenzima Q10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un
20 derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima), alterando por lo tanto la arquitectura del citoesqueleto de las células de sarcoma en el humano. En una modalidad, este método involucra la regulación descendente de la expresión de uno o más genes o proteínas del citoesqueleto.

25 En una modalidad, una molécula de CoQ10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) reduce el tamaño de tumor, inhibe el crecimiento de tumor y/o prolonga el tiempo
30 de supervivencia de un sujeto que lleva tumor. De acuerdo con lo anterior, esta invención también se relaciona con un método para tratar tumores en un humano u otro animal al administrar a tal humano o animal una cantidad efectiva, no tóxica de una molécula de CoQ10 (por ejemplo, CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o
35 un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima). Un experto en la técnica sería capaz, mediante experimentación de rutina, determinar que una cantidad efectiva, no tóxica sería para el propósito de tratar neoplasias. Por ejemplo, una cantidad de una molécula de CoQ10 terapéuticamente activa (por ejemplo,

CoQ10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima) puede variar de acuerdo con factores tales como la etapa de enfermedad (por ejemplo, etapa I versus etapa IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunosupresoras) y peso del sujeto, y la capacidad de la molécula CoQ10 para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ser ajustado para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diversas dosis divididas a diario, o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

En una modalidad, la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, se aplica tópicamente una o más veces por 24 horas durante seis semanas o más.

En una modalidad, la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, se administra en la forma de una crema de CoQ10 en una dosificación de entre 0.5 y 10 miligramos de la crema CoQ10 por centímetro cuadrado de piel, en donde la crema CoQ10 comprende entre 1 y 5% de Coenzima Q10. En una modalidad, la crema CoQ10 comprende aproximadamente 3% de Coenzima Q10. En una modalidad, la Coenzima Q10 se administra en la forma de una crema de CoQ10 en una dosificación de entre 3 y 5 miligramos de la crema CoQ10 por centímetro cuadrado de piel, en donde la crema CoQ10 comprende entre 1 y 5% de Coenzima Q10. En una modalidad, la crema CoQ10 comprende aproximadamente 3% de Coenzima Q10.

En ciertas modalidades de los métodos anteriores de tratamiento o prevención, el método sirve para modular uno o más genes (o proteínas) seleccionados del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo,

proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama,

15 Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina,

20 Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinase 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Rad17, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6,

25 P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1. En algunas modalidades, los

30 métodos de tratamiento o prevención sirven para modular una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veinticinco, treinta, o más de los genes anteriores (o proteínas).

En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención de la invención sirve para regular de forma ascendente el nivel de expresión de uno o más genes o cualesquier combinaciones de genes seleccionados del grupo que

5 consiste de LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Cadena Liviana

10 Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, proteína asociada a microtúbulo, beta tubulina, proteasoma alfa 3, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, proteína de choque térmico 27kD, factor de

15 elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, y receptor de secuencia de señal 1 delta, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOXI, IL4R, INPPL1, IRS2 y VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK,

20 ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), y MRP1. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención sirve para regular de forma ascendente una

25 combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veinticinco, treinta o más de los genes anteriores (o proteínas).

En modalidades adicionales, los métodos de tratamiento o prevención

30 proporcionados por la invención sirven para regular de forma descendente el nivel de expresión de uno o más genes o cualesquier combinaciones de genes seleccionados del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4,

35 BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina,

Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elngación de traducción eucariótico 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3 (homólogo 2 de canopia), enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, matriz de Metaloproteinasas 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), Neurolisina (NLN), MDC1, Laminina 2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención sirven para regular de forma descendente una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veinticinco, treinta o más de los genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad, los métodos de tratamiento o prevención proporcionados por la presente invención sirven para modular el nivel de expresión de los genes involucrados en la diabetes. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOX C2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención sirven para modular una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, o todos los diecinueve genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad adicional, los métodos de tratamiento o prevención sirven para regular de forma ascendente el nivel de expresión de genes involucrados en diabetes. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOX C2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, y/o VEGFA. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención regulan de forma ascendente una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, todos o doce genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad adicional, el método de tratamiento o prevención sirve para regular de forma descendente el nivel de expresión de genes involucrados en diabetes. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los métodos de

5 tratamiento o prevención regulan de forma descendente una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, o todos los siete genes anteriores (o proteínas).

En todavía otra modalidad, el método de tratamiento o prevención sirve

10 para modular el nivel de expresión de genes involucrados en angiogenia. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención modulan una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, o todos los siete genes del grupo anterior.

En una modalidad adicional, el método de tratamiento o prevención sirve para regular de forma ascendente el nivel de expresión de genes involucrados en angiogenia. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, y/o CXCL3. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o

15 20 prevención regulan de forma ascendente una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, o todos los cinco, genes del grupo anterior.

En una modalidad adicional, los métodos de tratamiento o prevención sirven para regular de forma descendente el nivel de expresión de genes involucrados en angiogenia. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, LAMA5, y/o PXLDC1. En una modalidad, los métodos de tratamiento o prevención regulan en forma descendente el LAMA5 y PXLDC1.

25

En otra modalidad, los métodos de tratamiento o prevención sirven para

30 modular el nivel de expresión de genes involucrados en apoptosis. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, genes que se modulan en los experimentos desritos aquí, es decir, los genes enumerados en las Tablas 2-9. En otra modalidad, los genes o proteínas involucradas en la apoptosis incluyen uno o más de JAB1, P53R2, receptor de Fosfatidilserina, Rab 5, AFX, MEKK4, HDAC2, HDAC4, PDK1,

35 Caspasa 12, fosfolipasa D1, p34cdc2, BTK, ASC2, VBubR1, PCAF, Raf1, MSK1, y mTOR. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento o prevención modulan una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete,

ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, o todos los diecinueve genes del grupo anterior.

V. Métodos Diagnósticos de la Invención

5

La invención proporciona métodos para diagnosticar un sarcoma. Los métodos de la presente invención se pueden practicar en conjunto con cualquier otro método utilizado por el practicante experto para pronosticar la recurrencia de un sarcoma y/o la supervivencia de un sujeto que se trata por un sarcoma. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden realizar en conjunto con un análisis morfológico o citológico de la muestra obtenida del sujeto. Los métodos citológicos podrían incluir detección inmunohistoquímica o de inmunofluorescencia (y cuantificación si es apropiado) de cualquier otro marcador molecular ya sea en sí mismo, en conjunto con otros marcadores, y/o en conjunto con los marcadores She. Otros métodos incluirían la detección de otros marcadores mediante PCR in situ, o al extraer tejido y cuantificar otros marcadores mediante PCR en tiempo real. El PCR se define como la reacción de cadena de polimerasa.

10

15

20

25

También se proporcionan los métodos para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia, radiación terapia, cirugía, terapia hormonal, o cualquier otro método terapéutico útil tratar un trastorno oncológico en un sujeto. En estos métodos se evalúa la cantidad de marcador en un par de muestras (una primer muestra no sujeta al régimen de tratamiento y una segunda muestra sujeta a por lo menos una porción del régimen de tratamiento).

30

La invención también proporciona un método para determinar si un sarcoma es agresivo. El método comprende determinar la cantidad de marcador presente en una célula y comparar la cantidad con una cantidad de control del marcador presente en una muestra de control, definida en las Definiciones, determinando de esta forma si un sarcoma es agresivo.

35

Los métodos de la invención también se pueden utilizar para seleccionar un compuesto que sea capaz de modular, es decir, reducir, la agresividad de un sarcoma. En este método, una célula neoplásica se pone en contacto con un compuesto de prueba, y se determina la capacidad del compuesto de prueba para modular la expresión y/o actividad de un marcador de la invención en la célula del sarcoma, seleccionando de esta forma un compuesto que es capaz de modular la agresividad del sarcoma.

Utilizando los métodos descritos aquí, se puede seleccionar una variedad de moléculas, que incluyen particularmente moléculas suficientemente pequeñas que son capaces de cruzar la membrana celular con el fin de identificar moléculas que modulan, por ejemplo, incrementan la expresión y/o actividad de un marcador de la invención. Los compuestos así identificados se pueden proporcionar a un sujeto con el fin de inhibir la agresividad de un sarcoma en el sujeto, para prevenir la recurrencia de un sarcoma en el sujeto, o tratar un sarcoma en el sujeto.

VI. Marcadores de la Invención

La invención se relaciona con marcadores (en lo sucesivo “marcadores” o “marcadores de la invención”), que se enumeran en las Tablas 2-9. La invención proporciona ácidos nucleicos y proteínas que se codifican por o corresponden a los marcadores (en lo sucesivo “ácidos nucleicos marcadores” y “proteínas marcadoras,” respectivamente). Estos marcadores son particularmente útiles en seleccionar la presencia de un sarcoma, en evaluar la agresividad y potencial metastásico de un sarcoma, evaluar si un sujeto está afligido con un sarcoma, identificar una composición para tratar un sarcoma, evaluar la eficacia de un compuesto influenciador de entorno para tratar un sarcoma, monitorear el progreso de un sarcoma, pronosticar la agresividad de un sarcoma, pronosticar la supervivencia de un sujeto con un sarcoma, pronosticar la recurrencia de un sarcoma y pronosticar si un sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma.

Un “marcador” es un gen cuyo nivel de expresión alterado en un tejido o célula de su nivel de expresión en tejido o célula normal o saludable se asocia con un estado de enfermedad, tal como un sarcoma. Un “ácido nucleico marcador” es un ácido nucleico (por ejemplo, mRNA, cADN) codificado por o que corresponde a un marcador de la invención. Tales ácidos nucleicos marcadores incluyen ADN (por ejemplo, cADN) que comprenden la secuencia parcial o completa de cualquiera de los genes que son marcadores de la invención o el complemento de tal una secuencia. Tales secuencias se conocen por un experto en la técnica y se pueden encontrar por ejemplo, en el sitio web del gobierno NIH PubMed. Los ácidos nucleicos marcadores también incluyen ARN que comprende la secuencia parcial o completa de cualquiera de los marcadores de gen de la invención o el complemento de tal una secuencia, en donde se reemplazan todos los residuos de timidina con residuos de uridina. Una “proteína marcadora” es una proteína codificada por o que corresponde a un marcador de la invención. Una proteína

marcadora comprende la secuencia parcial o completa de cualquiera de las proteínas marcadoras de la invención. Tales secuencias se conocen por un experto en la técnica y se pueden encontrar por ejemplo, en el sitio web del gobierno NIH PubMed. Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan de forma intercambiable.

Un fluido corporal "asociado al sarcoma" es un líquido que, cuando está en el cuerpo de un paciente, se pone en contacto o pasa a través de las células del sarcoma o en el cual las células o proteínas que se desprenden de las células del sarcoma son capaces de pasar. Ejemplos de fluidos corporales asociadas al sarcoma incluyen fluidos sanguíneos (por ejemplo, sangre completa, suero sanguíneo, sangre que tiene plaquetas retiradas de la misma), y se describen con más detalle a continuación. Muchos fluidos corporales asociados al trastorno del sarcoma pueden tener células del sarcoma en ellos, particularmente cuando las células hacen metástasis. Los fluidos que contienen células que pueden contener células del sarcoma incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, sangre que tiene las plaquetas retiradas de la misma, linfa, líquido prostático, orina y semen.

El nivel de expresión "normal" de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células de un sujeto humano o paciente no afligido con sarcoma.

Una "sobre-expresión" o "alto nivel de expresión" de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de prueba que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión, y es preferiblemente por lo menos dos veces, y más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, la muestra de un sujeto no saludable que no tiene la enfermedad asociada al marcador, es decir, sarcoma) y preferiblemente, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de control.

Un "bajo nivel de expresión" de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de prueba esto es por lo menos dos veces, y más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces más bajo que el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, la muestra de un sujeto no saludable que no tiene la enfermedad asociada al marcador, es decir, sarcoma) y preferiblemente, el nivel de expresión promedio del marcador en varias muestras de control.

Un "polinucleótido transcrito", o "transcripción de nucleótido" es un polinucleótido (por ejemplo un mRNA, nhARN, un cADN, o un análogo de tales ARN o cADN) que es complementario a o homólogo o con todos o una porción de un mRNA maduro hechos mediante transcripción de un marcador de la invención y el procesamiento normal post-transcripcional (por ejemplo acoplamiento), si lo hay, del transcrito de ARN, y la transcripción inversa del transcrito de ARN.

"Complementario" se refiere al concepto amplio de la complementariedad de secuencia entre las regiones bicatenarias del ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primer región de ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno específicos ("emparejamiento de bases") con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela a la primera región si el residuo es timina o uracilo.

De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de emparejamiento base con un residuo de una segunda de cadena de ácido nucleico que es antiparalela a la primera si el residuo es guanina. Una primer región de un ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo o diferente ácido nucleico si, cuando las dos regiones se disponen en una forma antiparalela, por lo menos un residuo de nucleótido de la primera región es capaz de emparejamiento base con un residuo de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo cual, cuando la primera y segunda porciones se disponen en una forma antiparalela, por lo menos aproximadamente 50%, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% de los residuos de nucleótido de la primera porción son capaces de emparejamiento base con residuos de nucleótido en la segunda porción. Más preferiblemente, todos los residuos de nucleótido de la primera porción son capaces de emparejamiento base con residuos de nucleótido en la segunda porción.

"Homólogo" como se utiliza aquí, se refiere a la similitud de secuencia de nucleótidos entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico o entre regiones de dos cadenas diferentes de ácido nucleico. Cuando una posición residuo de nucleótidos en ambas regiones está ocupada por el mismo residuo de nucleótido, entonces las regiones son homólogas en esa posición. Una primera

región es homóloga a una segunda región si por lo menos una posición de residuo de nucleótido de cada región está ocupada por el mismo residuo. La homología entre dos regiones se expresa en términos de la proporción de posiciones de los residuos de nucleótido de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo de nucleótido. Por vía de ejemplo, una región que tiene la secuencia de nucleótido 5'-ATTGCC-3' y una región que tiene la secuencia de nucleótido 5'-TATGGC-3' comparten 50% de homología. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo cual, por lo menos aproximadamente 50%, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% de las posiciones de residuo de nucleótido de cada una de las porciones está ocupada por el mismo residuo de nucleótido. Más preferiblemente, todas las posiciones de residuo nucleótido de cada una de las porciones están ocupadas por el mismo residuo de nucleótido.

Las "proteínas de la invención" abarcan proteínas marcadoras y sus fragmentos; proteínas marcadoras variantes y sus fragmentos; péptidos y polipéptidos que comprenden por lo menos 15 segmentos de aminoácido de un marcador o proteína marcadora variante; y proteínas de fusión que comprenden un marcador o proteína marcadora variante, o por lo menos 15 segmentos de aminoácido de un marcador o proteína marcadora variante.

La invención proporciona adicionalmente anticuerpos, derivados de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente con las proteínas marcadoras y fragmentos de las proteínas marcadoras de la presente invención. A menos que se especifique lo contrario aquí, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" abarcan ampliamente las formas de ocurrencia natural de los anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multi-específicos, así como también fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen por lo menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpo pueden comprender una proteína o grupo funcional químico conjugado a un anticuerpo.

En ciertas modalidades, los marcadores de la invención incluyen uno o más genes (o proteínas) seleccionados del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S 10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67,

KSR, HDAC4, BOB 1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B I), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a
 5 Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1
 10 delta, lamin B I, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200,
 15 Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP
 20 dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de
 25 Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de
 30 elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a
 35 c-myc- c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, RadI7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4

(respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1. En algunas modalidades, los

5 marcadores son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veinticinco, treinta, treinta y cinco, cuarenta, cuarenta y cinco, cincuenta o más de los genes anteriores (o proteínas).

10 En algunas modalidades, los marcadores de la invención son genes o proteínas que se regulan de forma ascendente luego de tratamiento de una célula de sarcoma con la Coenzima Q10. Los marcadores que se regulan de forma ascendente luego de tratamiento de un sarcoma con la Coenzima Q10 incluyen

15 LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína

20 alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, proteína asociada a microtúbulo, beta tubulina, proteasoma alfa 3, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, proteína de choque térmico 27kD, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1

25 (beta actina), Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, y receptor de secuencia de señal 1 delta, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2 y VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving,

30 SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), y MRP1. En algunas modalidades, los marcadores regulados de forma ascendente son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho,

35 diecinueve, veinte, veinticinco, treinta o más de los genes anteriores (o proteínas).

En modalidades adicionales, los marcadores son genes o proteínas que se regulan de forma descendente en una célula de sarcoma luego de tratamiento con

CoQ10. Los marcadores que se regulan de forma descendente incluyen ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3 (homólogo 2 de canopia), enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), Neurolisina (NLN), MDC1, Laminina 2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1. En algunas modalidades, los marcadores regulados de forma descendente son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veinticinco, treinta o más de los genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad, los marcadores de la invención son genes o proteínas asociadas con o involucradas en la diabetes. Tales genes o proteínas involucradas en la diabetes incluyen, por ejemplo, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOX C2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los marcadores de la invención son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, o todos los diecinueve genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad, los marcadores asociados con o involucrados en la diabetes son genes o proteínas que se regulan de forma ascendente luego de

tratamiento de una célula de sarcoma con CoQ10. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOX C2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2, y/o VEGFA. En algunas modalidades, los marcadores regulados de forma ascendente involucrados en la diabetes son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, todos o doce genes anteriores (o proteínas).

En una modalidad adicional, los marcadores asociados con o involucrados en la diabetes son genes o proteínas que se regulan de forma descendente luego e tratamiento de una célula de sarcoma con CoQ10. Tales genes incluyen, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los marcadores regulados de forma descendente involucrados en la diabetes son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, o todos los siete genes anteriores (o proteínas).

En todavía otra modalidad, los marcadores de la invención son genes o proteínas asociadas con o involucradas en la angiogenia. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, LAMA5, y/o PXLDC1. En algunas modalidades, los marcadores involucrados en la angiogenia son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, o todos los siete genes del grupo anterior.

En una modalidad adicional, los marcadores asociados con o involucrados en angiogenia son genes o proteínas que se regulan de forma ascendente luego de tratamiento de una célula de sarcoma con CoQ10. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, y/o CXCL3. En algunas modalidades, los marcadores regulados de forma ascendente asociados con la angiogenia son una combinación de por lo menos dos, tres, cuatro, o todos los cinco, genes del grupo anterior.

En una modalidad adicional, los marcadores asociados con o involucrados en angiogenia son genes o proteínas que se regulan de forma descendente luego de tratamiento de una célula de sarcoma con CoQ10. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, LAM A5, y/o PXLDC1. En una modalidad, los marcadores regulados de forma descendente son LAMA5 y PXLDC1.

En otra modalidad, los marcadores son genes o proteínas involucradas en la apoptosis. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, los genes enumerados en

las Tablas 2-9. En una modalidad, los marcadores involucrados en la apoptosis incluyen JAB 1, P53R2, receptor de Fosfatidilserina, Rab 5, AFX, MEKK4, HDAC2, HDAC4, PDK1, Caspasa 12, fosfolipasa D1, p34cdc2, BTK, ASC2, BubR1, PCAF, Raf1, MSK1, y mTOR.

5

Se describen varios aspectos de la invención en detalle adicionalmente en las siguientes subsecciones.

1. Moléculas de Ácido Nucleico Aisladas

10

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico aisladas, que incluye ácidos nucleicos que codifican una proteína marcadora o una porción de la misma. Los ácidos nucleicos aislados de la invención también incluyen moléculas de ácido nucleico suficientes para uso como sondas de hibridación para identificar moléculas marcadoras de ácido nucleico, y fragmentos de moléculas marcadoras de ácido nucleico, por ejemplo, aquellas adecuadas para uso como cebadores PCR para la amplificación o mutación de moléculas marcadoras de ácido nucleico. Como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" está destinada a incluir moléculas de ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, mARN) y análogos del ADN o ARN generados utilizando nucleótidos análogos. La molécula ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Una molécula ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. En una modalidad, una molécula ácido nucleico "aislada" está libre de secuencias (preferiblemente las secuencias que codifican proteínas) que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias modalidades, la molécula ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kB, 4 kB, 3 kB, 2 kB, 1 kB, 0.5 kB o 0.1 kB de secuencias de nucleótido que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. En otra modalidad, una molécula ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cADN, puede ser sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. Una molécula de

ácido nucleico que es sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% de ácido nucleico heterólogo (también denominada aquí como un "ácido nucleico contaminante").

5

Se puede aislar una molécula ácido nucleico de la presente invención utilizando técnicas biológicas moleculares estándar y la información de secuencia en los registros de las bases de datos descritos aquí. Utilizando toda o una porción de tales secuencias de ácido nucleico, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar hibridación estándar y técnicas de clonación (por ejemplo, como se describe en Sambrook *et al.*, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15

Se puede amplificar una molécula ácido nucleico de la invención utilizando cADN, mRNA, o ADN genómico como una plantilla y cebadores de oligonucleótido apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y se caracteriza por análisis de secuencia de ADN. Adicionalmente, los nucleótidos que corresponden a toda o una porción de una molécula de ácido nucleico de la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

20

En otra modalidad preferida, una molécula ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un marcador ácido nucleico o a la secuencia de nucleótido de un ácido nucleico que codifica una proteína marcadora. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótido dada es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótido dada que se puede hibridar a la secuencia de nucleótido dada formando por lo tanto un dúplex estable.

25

30

Más aún, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solo una porción de una secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de ácido nucleico de longitud completa comprende un marcador de ácido nucleico o que codifica una proteína marcadora. Se pueden utilizar tales ácidos nucleicos, por ejemplo, como una sonda o cebador. La sonda/cebador típicamente se utiliza como uno o más oligonucleótidos sustancialmente

35

purificados. El oligonucleótido típicamente comprende una región de secuencia de nucleótido que hibrida bajo condiciones estrictas para por lo menos aproximadamente 7, preferiblemente aproximadamente 15, más preferiblemente aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, o 400 o más nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de la invención.

Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para detectar la transcripción o secuencias genómicas correspondientes a uno o más marcadores de la invención. La sonda comprende un grupo de etiqueta unida a éste, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o una enzima cofactor. Tales sondas se pueden utilizar como parte de un equipo de prueba diagnóstica para la identificación de células o tejidos que expresan mal la proteína, tal como al medir los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo, detectar los niveles de mRNA o determinar si un gen que codifica la proteína se ha mutado o suprimido.

La invención abarca adicionalmente moléculas de ácido nucleico que difieren, debido a degeneración del código genético, a partir de la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos que codifican una proteína marcadora, y por lo tanto codifican la misma proteína.

Se apreciará por los expertos en la técnica que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos puede existir dentro de una población (por ejemplo, la población humana). Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre los individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Un alelo es uno de un grupo de genes que se producen alternativamente en un sitio genético dado. Adicionalmente, se apreciará que también pueden existir los polimorfismos de ADN que afectan los niveles de expresión de ARN que pueden afectar el nivel de expresión general de ese gen (por ejemplo, al afectar a la regulación o degradación).

Como se utiliza aquí, la frase "variante alélica" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se produce en un sitio dado para un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos.

Como se utiliza aquí, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácidos nucleicos que comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención. Tales variaciones alélicas naturales típicamente pueden resultar en una variación de 1-5% en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos se pueden identificar por la secuenciación del gen de interés en un número de individuos diferentes. Esto se puede llevar a cabo fácilmente mediante el uso de sondas de hibridación para identificar el mismo sitio genético en una variedad de individuos. Cualquiera y todas esas variaciones de nucleótidos que resultan en polimorfismos de aminoácidos o variaciones que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

En otra modalidad, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene por lo menos 7, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550, 650, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3500, 4000, 4500, o más nucleótidos en longitud y se hibrida bajo condiciones estrictas a un marcador de ácido nucleico o a un ácido nucleico que codifica una proteína marcadora. Como se utiliza aquí, el término “se hibrida bajo condiciones estrictas” está destinado a describir condiciones para la hibridación y lavado bajo el cual las secuencias de nucleótido por lo menos 60% (65%, 70%, preferiblemente 75%) idénticas una a la otra típicamente permanecen en forma híbrida entre sí. Se conocen tales condiciones estrictas por aquellos expertos en la técnica y se pueden encontrar en las secciones 6.3.1-6.3.6 de *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). Un ejemplo no limitante preferido de las condiciones estrictas de hibridación son hibridación en sodio 6X cloruro de sodio /citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ° C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS 0,1% a 50-65° C.

Adicionalmente a las variantes alélicas de origen natural de una molécula de ácido nucleico de la invención que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará adicionalmente que los cambios de secuencia puede ser introducido mediante mutación lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, sin alterar la actividad biológica de la proteína codificada. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que llevan a sustituciones de aminoácidos en “residuos de aminoácidos” no esenciales. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que se puede

alterar a partir de la secuencia de tipo natural, sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que no se han conservado o sólo se semi-conservan entre homólogos de diversas especies pueden ser no-
5 esenciales para la actividad y así serían objetivos probables de alteración. Alternativamente, los residuos de aminoácidos que se conservan entre los homólogos de diversas especies (por ejemplo, murino y humano) pueden ser esenciales para actividad y así no sería objetivos probables para alteración.

10 De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína marcadora variante que contiene cambios en los residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad. Tales proteínas marcadoras variantes difieren en la secuencia de aminoácido desde las proteínas marcadoras, aún retienen actividad biológica. En
15 una modalidad, tal una tal una variante de proteína marcadora un aminoácido tiene una secuencia que es por lo menos aproximadamente 40% idéntica, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácido de una proteína marcadora.

20 Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante de proteína marcadora se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de los marcadores de los ácidos nucleicos, de tal manera que una o varias sustituciones, adiciones o supresiones de residuos de aminoácidos se introducen en la proteína
25 codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tales como mutagenia dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que se reemplaza el residuo de aminoácido con un
30 residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas
35 laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo,

103

tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación, tal como mediante mutagenia de saturación, y los mutantes resultantes se pueden examinar para la actividad biológica para identificar mutantes que conservan la actividad. Después de la mutagenia, la proteína codificada se puede expresar recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína.

La presente invención abarca moléculas de ácido nucleico anticodificante, es decir, moléculas que son complementarias a un ácido nucleico codificante de la invención, por ejemplo, complementario de la cadena codificante de una molécula de cADN de marcador bicatenario o complementarias a una secuencia de mRNA marcadora. En consecuencia, un ácido nucleico anticodificante de la invención puede formar enlaces de hidrógeno con (es decir, hibridado con) un ácido nucleico codificante de la invención. El ácido nucleico anticodificante puede ser complementario a una cadena de codificación entera, o sólo a una porción de la misma, por ejemplo, toda o parte de la región de codificación de proteína (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico anticodificante también puede ser anticodificante para la toda o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína marcadora. Las regiones no codificantes ("regiones no traducidas 5' y 3' ") son las secuencias 5' y 3' que flanquean en la región codificante y no se traducen en aminoácidos.

Un oligonucleótido anticodificante puede tener, por ejemplo, alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 o más nucleótidos en longitud. Un ácido nucleico anticodificante de la invención se puede construir utilizando síntesis química y reacciones de unión enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico anticodificante (por ejemplo, un oligonucleótido anticodificante) se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados diversamente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos anticodificante y codificante, por ejemplo, se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados, que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico anticodificante incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-chlorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina,

N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico anticodificante se puede producir fisiológicamente utilizando un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación anticodificante (es decir, ARN transcrito del ácido nucleico insertado será de una orientación anticodificante a un ácido nucleico objetivo de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico anticodificante de la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan in situ de tal manera que se hibridan con o se unen a mmARN celular y/o ADN genómico que codifica una proteína marcadora para inhibir así la expresión del marcador, por ejemplo, al inhibir la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por la complementariedad de nucleótidos convencionales para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico anticodificante que se une a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Ejemplos de una ruta de administración de moléculas anticodificantes de ácidos nucleicos de la invención incluyen la inyección directa en un sitio del tejido o infusión del ácido nucleico anticodificante en el fluido corporal asociado con el sarcoma. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico anticodificantes de pueden modificar a células seleccionadas objetivo y después se administra sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, se pueden modificar las moléculas anticodificantes de tal manera que se unan específicamente a los receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al ligar las moléculas de ácido nucleico anticodificante a péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores de la superficie celular o antígenos. Las moléculas de ácido nucleico anticodificantea también se puede suministrar a las células utilizando los vectores descritos aquí. Para lograr suficientes concentraciones intracelulares de las moléculas anticodificantes, se prefieren las construcciones de vectores en las que se coloca la molécula de ácido nucleico anticodificante bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

Una molécula de ácido nucleico anticodificante de la invención puede ser una molécula de un ácido nucleico-anomérico. Una molécula de un ácido nucleico-anomérico forma híbridos bicatenarios con ARN complementario en los que, a diferencia de las unidades a usuales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier et al, 1987 *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico anticodificante también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un quimérica ARN-ADN analógica (Inoue et al 1987, *FEBS Lett.* 215 :327-330).

La invención también abarca las ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de dividir un ácido nucleico monocatenario, tal como un mRNA, el cual tiene una región complementaria. Así, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo como se describe en Haselhoff y Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591) se puede utilizar para dividir catalíticamente las transcripciones de mRNA para inhibir así la traducción de la proteína codificada por el mRNA. Una ribozima que tiene especificidad para una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína marcadora se puede diseñar con base en la secuencia de nucleótidos de un cADN correspondiente al marcador. Por ejemplo, un derivado de un *Tetrahymena* L-19 IVS ARN se puede construir en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se va a dividir (véase Cech et al. Patente Estadounidense No. 4,987,071; y Cech et al. Patente Estadounidense No. 5,116,742). Alternativamente, un mRNA que codifica un polipéptido de la invención se puede utilizar para seleccionar un ARN catalítico con una actividad ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN (véase, por ejemplo, Bartel and Szostak, 1993, *Science* 261: 1411-1418).

La invención también abarca moléculas de ácidos nucleicos que forman estructuras helicoidales triples. Por ejemplo, la expresión de un marcador de la invención de puede inhibir al objetivar las secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen que codifica el ácido nucleico o proteína marcadora (por ejemplo, el promotor y/o potenciador) para formar estructuras helicoidales triples que evitar la transcripción del gen en las células objetivo. Véase en general, Helene (1991), *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene (1992) *Ann. NY. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

En diversas modalidades, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden modificar en el grupo funcional base, grupo funcional de azúcar, estructura principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura principal de fosfato desoxirribosa de los ácidos nucleicos se puede modificar para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup *et al.*, 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23). Como se utiliza aquí, los términos “ ácidos nucleicos de péptido “ o “PNA” se refieren a imitadores de ácidos nucleicos, por ejemplo, imitadores de ADN, en los que se sustituye la estructura principal de fosfato desoxirribosa por una estructura principal de pseudopéptido y sólo se retienen las cuatro bases nitrogenadas naturales. La estructura principal neutra de PNAs se ha mostrado por permitir la hibridación específica a ADN y ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar utilizando protocolos de síntesis de péptido en fase sólida estándar como se describe en Hyrup *et al.* (1996), *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675.

Los PNA se pueden utilizar en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, los PNA se pueden utilizar como agentes anticodificante o de antígeno para la modulación específica a secuencia de la expresión génica, por ejemplo, al inducir la transcripción o detención de traducción o inhibir la replicación. Los PNA también se pueden utilizar, por ejemplo, en el análisis de mutaciones de par base únicas en un gen mediante, por ejemplo, pinzamiento PCR dirigido a ANP; como enzimas de restricción artificiales cuando se utilizan en combinación con otras enzimas, por ejemplo, SI nucleasas (Hyrup (1996), *supra*, o como sondas o cebadores para la secuencia e hibridación de ADN (Hyrup de 1996, *supra*; Perry-O'Keefe *et al.*, 1996, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93 14670-675).

En otra realización, los PNA se pueden modificar, por ejemplo, para mejorar su estabilidad o la absorción celular, al adherir grupos auxiliares lipófilos o de otro tipo al PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de suministro de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden generar quimeras de PNA-ADN que pueden combinar las propiedades ventajosas de ANP y ADN. Tales quimeras permiten las enzimas de reconocimiento de ADN, por ejemplo, RNasa H y polimerasas de ADN, para interactuar con la porción de ADN, mientras que la porción de PNA proporcionaría alta afinidad de unión y la especificidad. Las quimeras PNA-ADN se pueden ligar utilizando ligadores de longitudes apropiadas seleccionados en términos de base

de apilamiento, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación (Hyrup, 1996, *supra*). La síntesis de quimeras de PNA-ADN se puede realizar como se describe en Hyrup (1996), *supra*, y Finn et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17):3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN se puede sintetizar sobre un
5 soporte sólido utilizando química acoplamiento de fosforamidita estándar y análogos de nucleósidos modificados. Los compuestos tales como 5'-(4-metoxitritilo) amino-5'-desoxi-timidina fosforamidito se pueden utilizar como un enlace entre el PNA y el extremo 5' del ADN (Mag. et al, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 5973-88). Los monómeros de PNA luego se acoplan de una manera gradual
10 para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA 5' y un segmento de ADN 3' (Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24 (17):3357-63). Alternativamente, las moléculas quiméricas se pueden sintetizar con un segmento de ADN 5' y un segmento PNA 3' (Peterser et al, 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett* 5: 1119-11124).

15 En otras modalidades, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para objetivar los receptores de la célula anfitriona in vivo), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; publicación PCT No. WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver , por
20 ejemplo, Publicación PCT No. WO 89/10134). Adicionalmente, los oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de división activados por hibridación (ver, por ejemplo, Krol et al, 1988, *Bio/Techniques* 6:958-976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5:539-549). Para este fin, el
25 oligonucleótido se puede conjugar a otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación activado con hibridación, agente de transporte, agente de división activado por hibridación, etc.

30 La invención también incluye ácidos nucleicos de faros moleculares que tienen por menos una región que es complementaria a un ácido nucleico de la invención, de tal manera que el faro molecular es útil para cuantificar la presencia del ácido nucleico de la invención en una muestra. Un ácido nucleico de "faro molecular" es un ácido nucleico que comprende un par de regiones
35 complementarias y que tiene un fluoróforo y un inactivador fluorescente asociado con el mismo. El fluoróforo y el inactivador están asociados con diferentes porciones del ácido nucleico en tal una orientación que cuando las regiones complementarias se hibridan una con la otra, la fluorescencia del fluoróforo se

inactiva por el inactivador. Cuando las regiones de complementariedad del ácido nucleico no se hibridan una con la otra, la fluorescencia del fluoróforo se inactiva en un grado menor. Se describen ácidos nucleicos de faros moleculares, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.876.930.

5

2. Proteínas y Anticuerpos Aislados

Un aspecto de la invención se relaciona con las proteínas marcadoras aisladas y porciones biológicamente activos de las mismas, así como también
10 fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o fragmento de la misma. En una modalidad, la proteína marcadora natural se puede aislar de las fuentes de células o de tejidos mediante un esquema de purificación adecuado utilizando técnicas de purificación de proteínas estándar. En otra modalidad, una proteína o
15 péptido que comprende la totalidad o un segmento de la proteína marcadora se produce mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, se pueden sintetizar tales proteínas o péptidos químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

Una porción de proteína "aislada" o "purificada" o biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido de la que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular"
25 incluye preparaciones de proteína en las que se separa la proteína a partir de componentes celulares de las células de las cuales se aislaron o produjeron recombinantemente. Así, la proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también
30 denominada aquí como una "proteína contaminante"). Cuando la porción de proteína o porción biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, también es preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando la proteína se
35 produce mediante síntesis química, está preferiblemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. De acuerdo con lo anterior tales preparaciones de la

proteína tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de los precursores químicos o compuestos diferentes del polipéptido de interés.

Las porciones biológicamente activa de una proteína marcadora incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína marcadora, que incluyen más pocos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y exhiben por lo menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína marcadora de la invención puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos en longitud. Más aún, otras porciones biológicamente activas, en la que se eliminan otras regiones de la proteína marcadora, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar para una o más de las actividades funcionales de la forma natural de la proteína marcadora.

Las proteínas marcadoras preferidas se codifican mediante secuencias de nucleótidos que comprenden las secuencias que codifican cualquiera de los genes enumerados en las Tablas 2-9. Otras proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 40%, preferiblemente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% o 99%) a una de estas secuencias y retienen la actividad funcional de la proteína marcadora correspondiente de origen natural que todavía difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagenia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Preferiblemente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias se calcula utilizando un alineamiento global. Alternativamente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias se calcula utilizando un

alineamiento local. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = #de posiciones idénticas/# total de posiciones (por ejemplo, traslapamiento de posiciones) x 100). En una modalidad, las dos

5 secuencias son de la misma longitud. En otra modalidad, las dos secuencias no tienen la misma longitud.

La determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido

10 de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul Proc (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:5873-5877. Tal un algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las

15 búsquedas de nucleótidos BLAST de pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de homólogos de nucleótidos para algunas moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden realizar con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de

20 homólogos de aminoácidos para unas moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con espacios para propósitos de comparación, una nueva versión del algoritmo BLAST llamado Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, que es capaz de realizar alineamientos locales con espacios para los programas de BLASTN, BLASTP y BLASTX. Alternativamente, se puede utilizar PSI-BLAST para realizar

25 una búsqueda reiterada que detecte las relaciones distantes entre las moléculas. Cuando se utiliza los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-BLAST, se puede utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo no limitante

30 preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de las secuencias es el algoritmo de Myers and Miller, (1988) *CABIOS* 4: 11-17. Este algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácidos, se puede utilizar

35 una tabla de residuo peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12, y una penalidad de espacio de 4. Aún otro algoritmo útil para identificar las regiones de similitud de secuencia local y la alineación es el algoritmo FASTA como se describe en Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.

Cuando se utiliza el algoritmo FASTA para comparar secuencias de nucleótidos o aminoácidos, una tabla de residuo de peso PAM120, por ejemplo, se puede utilizar con un valor k -tupla de 2.

5 El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin que se permitan espacios. En el cálculo del por ciento de la identidad, sólo se cuentan coincidencias exactas.

10 La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión que comprenden una proteína marcadora o un segmento de la misma. Como se utiliza aquí, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende o parte (preferiblemente una parte biológicamente activa) de una proteína marcadora ligada operablemente a un polipéptido heterólogo (es decir, polipéptido diferente de la proteína marcadora). Dentro de la proteína de fusión, el término "ligada operablemente" está destinado a indicar que la proteína marcadora o el segmento de la misma y el polipéptido heterólogo se fusionan en marco entre sí. El polipéptido heterólogo se puede fusionar con el terminal amino o el terminal carboxilo de la proteína marcadora o segmento.

20 Una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST en la cual se fusiona una proteína marcadora o segmento al terminal carboxilo de las secuencias GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la invención.

25 En otra modalidad, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su terminal amino. Por ejemplo, la secuencia señal natural de una proteína marcadora e puede retirar y reemplazar con una secuencia de señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de la envoltura de baculovirus se puede utilizar como una secuencia señal heteróloga (Ausubel et al, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias de secreción de melitina y fosfatasa alcalina de placenta humana (Stratagene, La Jolla, California). En aún otro ejemplo, las secuencias de señal heterólogas procarióticas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook et al, supra) y la señal secretora de proteína A de (Pharmacia Biotech; Piscataway, Nueva Jersey).

En todavía otra modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de inmunoglobulina en el que toda o parte de una proteína marcadora se fusiona a las secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas y administrar a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (enlace soluble o de membrana) y una proteína sobre la superficie de una célula (receptor), para suprimir por lo tanto la transducción de señales in vivo. La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede utilizar para afectar a la biodisponibilidad de un ligando cognato de una proteína marcadora. La inhibición de la interacción ligando/ receptor puede ser útil terapéuticamente, para el tratamiento de trastornos proliferativos y de diferenciación y para modular la supervivencia celular (por ejemplo, la promover o inhibir). Más aún, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de la invención se pueden utilizar como inmunógenos para producir anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora en un sujeto, para purificar ligandos y en ensayos de selección para identificar moléculas que inhiben la interacción de la proteína marcadora con ligandos.

Las proteínas quiméricas y de fusión de la invención se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar. En otra modalidad, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos.

Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo utilizando los cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar y re-amplificar para generar una secuencia del gen quimérico (véase, por ejemplo, Ausubel et al, supra). Más aún, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente que ya codifican una fracción de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se puede clonar en tal un vector de expresión de tal manera que la fracción de fusión está ligado en marco con el polipéptido de la invención.

Una secuencia de señal se puede utilizar para facilitar la secreción y el aislamiento de proteínas marcadoras. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que se dividen generalmente de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos

de división. Tales péptidos de señal contienen sitios de procesamiento que permiten la división de la secuencia de señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la ruta secretora. Así, la invención se relaciona con las proteínas marcadoras, proteínas de fusión o segmentos de las mismas que tienen una secuencia de señal, así como también para tales proteínas de las cuales la secuencia señal se ha dividido proteolíticamente (es decir, los productos de división). En una modalidad, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal se pueda ligar de forma operatible en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína marcadora o un segmento de la misma. La secuencia de señal dirige la secreción de la proteína, tal como de un anfitrión eucariótico en el cual se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se divide posterior o simultáneamente. La proteína luego se puede purificar fácilmente del medio extracelular mediante métodos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal se puede ligar a la proteína de interés utilizando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

La presente invención también se relaciona con las variantes de las proteínas marcadoras. Tales variantes tienen una secuencia de aminoácidos alterada que pueden funcionar como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes se pueden generar mediante mutagenia, por ejemplo, mutación de punto discreto o truncamiento. Un agonista puede retener sustancialmente el mismo, o un subconjunto de las actividades biológicas de origen natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la proteína, por ejemplo, al unir competitivamente a un miembro en dirección 3' o dirección 5' de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. Así, los efectos biológicos específicos se pueden obtener mediante tratamiento con una variante de la función limitada.

El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína puede tener menos efectos secundarios en un sujeto con relación al tratamiento con la forma de origen natural de la proteína.

Las variantes de una proteína marcadora que funciona como agonistas (miméticos) o como antagonistas se pueden identificar al seleccionar bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncación de la proteína de la invención para actividad de agonista o antagonista. En una modalidad, una

colección variada de variantes se genera por mutagenia combinatoria en el nivel del ácido nucleico y se codifica por una gen colección variada. Una colección variada de variantes se pueden producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias de genes tales que un degenerado conjunto de secuencias de proteínas potenciales es expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo , para la visualización de fagos). Hay una variedad de métodos que pueden ser utilizados para producir bibliotecas de variantes potenciales de las proteínas marcadoras desde una secuencia de oligonucleótido degenerado. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, 1983, *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al, 1984, *Annu Rev. Biochem* 53:323; Itakura et al, 1984, *Science* 198: 1056; Ike et al, 1983 *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Adicionalmente, las bibliotecas de segmentos de una proteína marcadora se pueden utilizar para generar una población de polipéptidos variada para el cribado y posterior selección de proteínas marcadoras variantes o segmentos de las mismas. Por ejemplo, una colección de fragmentos de secuencia de codificación se pueden generar al tratar un fragmento PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa bajo condiciones en donde las muescas se producen sólo aproximadamente una vez por molécula, la desnaturalización del ADN bicatenario, renaturalización del ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir pares codificante/anticodificante de diferentes productos con muesca, eliminación de porciones monocatenarios de dúplex reformados por tratamiento con nucleasa SI, y ligar la colección de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una colección de expresión que codifica el terminal amino y los fragmentos internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

Se conocen varias técnicas en el arte para los productos génicos seleccionados de las bibliotecas combinatorias realizadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para la selección de bibliotecas de cADN para los productos de genes que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas utilizadas más ampliamente, que son susceptibles a alto análisis de rendimiento ,para la selección de grandes bibliotecas de genes típicamente incluyen la clonación de la colección de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la colección resultante de vectores, y expresar los genes combinatorios bajo condiciones en las que la detección de una

actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detecta. La mutagenia de conjunto recursiva (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de selección para identificar las variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.*, 1993, *Protein Engineering* 6(3):327- 331).

Otro aspecto de la invención se relaciona con anticuerpos dirigidos contra una proteína de la invención. En modalidades preferidas, los anticuerpos unen específicamente una proteína marcadora o un fragmento de la misma. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" como se utiliza de forma intercambiable aquí se refieren a moléculas de inmunoglobulina, así como también fragmentos y derivados de las mismas que comprenden una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, (es decir, tal una porción contiene un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, tal como una proteína marcadora, por ejemplo, un epítipo de una proteína marcadora). Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de la invención es un anticuerpo que se une a la proteína, pero no une sustancialmente otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que contiene naturalmente la proteína. Ejemplos de una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina incluye, pero no se limita a, fragmentos (scAb), F(ab) y F(ab')₂ de anticuerpos monocatenarios.

Una proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma se puede utilizar como un inmunógeno para generar anticuerpos. La proteína de longitud completa se puede utilizar o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos antigénicos de péptidos para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de una proteína de la invención comprende por lo menos 8 (preferiblemente 10, 15, 20, o 30 o más) residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de la invención, y abarca por lo menos un epítipo de la proteína de tal manera que un anticuerpo elevado contra el péptido forma un complejo inmune específico con la proteína. Los epítopos preferidos abarcados por el péptido antigénico son regiones que se ubican sobre la superficie de las proteínas, por ejemplo regiones hidrófilas. El análisis de la secuencia hidrofobicidad, análisis de secuencia de hidrofiliidad, o análisis similares se pueden utilizar para identificar regiones hidrófilas. En modalidades preferidas, una proteína marcadora aislado o fragmento de la misma se utiliza como un inmunógeno.

Un inmunógeno típicamente se utiliza para preparar anticuerpos al inmunizar un sujeto adecuado (es decir inmunocompetente) tal como un conejo, cabra, ratón, u otro mamífero o vertebrado. Una preparación inmunogénica adecuada puede contener, por ejemplo, proteínas o péptido recombinantemente expresado o químicamente sintetizado en. La preparación puede incluir adicionalmente un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante similar. Las composiciones de inmunógeno preferidas son aquellas que no contienen otras proteínas humanas tales como, por ejemplo, las composiciones inmunógeno hechas utilizando una célula anfitriona no humana para la expresión recombinante de una proteína de la invención. En tal forma, las composiciones de anticuerpos resultantes han se reducido no hay unión de las proteínas humanas diferentes de una proteína de la invención.

La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza aquí, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de immunoreaccionar con un epítipo particular. Las composiciones preferidas de anticuerpos policlonales y monoclonales son las que se han seleccionado para anticuerpos dirigidos contra una proteína de la invención. Preparaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales particularmente preferidas son las que contienen sólo anticuerpos dirigidos contra una proteína marcadora o fragmento de la misma.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar al inmunizar un sujeto adecuado con una proteína de la invención como un inmunógeno El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorear con el tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoenzimático ligado enzima (ELISA) utilizando polipéptido inmovilizado. En un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos específicos son más altos, se pueden obtener células que producen anticuerpos del sujeto y se utilizan para preparar anticuerpos monoclonales (mAb) mediante técnicas estándar, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, la técnica de hibridoma de célula B humana (véase Kozbor et al., 1983, *Immunol. Today* 4:72), la técnica de hibridoma de EBV (véase Cole et al., pp 77-96 *In Monoclonal Antibodies and Cancer Therap*, Alan R. Liss, Inc., 1985) o

técnicas trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (ver generalmente *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. ed., John Wiley & Sons, New York, 1994). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan al cribar los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para anticuerpos que unen el polipéptido de interés, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA estándar.

Como alternativa para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína de la invención y aislar mediante selección de una colección de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una colección que exhibe anticuerpo fago) con el polipéptido de interés. Los equipos para generar y seleccionar bibliotecas que exhiben fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01, y el Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, Catalog No. 240612). Adicionalmente, ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para uso en generar y seleccionar colección que exhibe anticuerpos se puede encontrar en, por ejemplo, Patente Estadounidense No 5.223.409; publicación PCT No. WO 92/18619; Publicación PCT No. WO 91/17271; publicación PCT WO 92/20791, publicación PCT WO 92/15679; publicación PCT WO 93/01288; publicación PCT WO 92/01047; publicación PCT WO 92/09690, publicación PCT No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275 a 1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734.

La invención también proporciona anticuerpos recombinantes que unen específicamente una proteína de la invención. En modalidades preferidas, los anticuerpos recombinantes unen específicamente una proteína marcadora o fragmento de la misma. Los anticuerpos recombinantes incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, anticuerpos de monocatenarios y anticuerpos multi-específicos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un AcM murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al, Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Boss et al., Patente Estadounidense No. 4,816,397, que se incorporan aquí por referencia en su totalidad). Los anticuerpos monocatenarios tienen un sitio de unión al antígeno y consisten de un solo

polipéptido. Ellos se pueden producir mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Ladner et. Al Patente de Estadounidense No. 4,946,778 (que se incorpora aquí por referencia en su totalidad); Bird et al, (1988) *Science* 242:423-426; Whitlow et al, (1991) *Methods in Enzymology* 2: 1-9; Whitlow et al. , (1991) *Methods in Enzymology* 2:97-105, y Huston et al, (1991) *Methods in Enzymology Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications* 203:46-88. Los anticuerpos multi-específicos son moléculas de anticuerpos que tienen por lo menos dos sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a antígenos diferentes. Tales moléculas se pueden producir mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, utilizando métodos descritos en Segal, Patente Estadounidense No. 4,676,980 (cuya descripción se incorpora aquí por referencia en su totalidad); HoUiger et al, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Whitlow et al, (1994) *Ing. proteína*. 7: 1017-1026 y Patente Estadounidense No. 6,121,424.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen uno o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.585,089,, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.) Se pueden producir anticuerpos monoclonales humanizados mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte, por ejemplo mediante los métodos descritos en la Publicación PCT No.WO 87/02671; solicitud de patente europea 184,187; solicitud de patente europea Patente Estadounidense No. 4,816,567; Solicitud de Patente Europea 125,023; Better et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521 - 3526, Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1.985) *Science* 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) *Bio/Techniques* 4:214, patente de EE.UU. 5.225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Más particularmente, se pueden producir los anticuerpos humanizados, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes cadenas pesada y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o

una porción de un polipéptido que corresponde a un marcador de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos alojados por los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de células B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Así, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, Patente Estadounidense 5.625,126; Patente Estadounidense 5.633,425; Patente Estadounidense 5.569,825; Patente Estadounidense 5.661,016; y Patente Estadounidense 5.545,806. Adicionalmente, las compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), se pueden conectar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado utilizando una técnica conocida como "selección guiada". En este método un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo murino, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., 1994, *Bio/Technology* 12:899-903).

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar después de la producción (por ejemplo, de la sangre o el suero del sujeto) o síntesis y se purifica adicionalmente mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos IgG se pueden purificar mediante cromatografía de proteína A. Los anticuerpos específicos para una proteína de la invención se pueden seleccionar o (por ejemplo, parcialmente purificar) o purificar mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se produce una proteína recombinantemente expresada y purificada (o parcialmente purificada) de la invención como se describe aquí, y acoplada covalentemente o no covalentemente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna luego se puede utilizar para purificar por afinidad anticuerpos específicos para las proteínas de la invención a partir de una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra un gran número de epítipos diferentes, generando así una composición de anticuerpos

sustancialmente purificada, es decir, una que está sustancialmente libre de anticuerpos de contaminación. Por una composición de anticuerpos sustancialmente purificada se entiende, en este contexto, la muestra que contiene anticuerpos a lo sumo sólo el 30% (en peso seco) de anticuerpos de contaminación dirigidos contra epítomos distintos de aquellos de la proteína deseada de la invención, y preferiblemente a lo sumo 20 %, aún más preferiblemente como máximo 10%, y más preferiblemente más del 5% (en peso seco) de la muestra son anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpo purificado significa que por lo menos 99% de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína deseada de la invención.

En una modalidad preferida, los anticuerpos sustancialmente purificados de la invención se pueden unir específicamente a un péptido de señal, una secuencia secretada, un dominio extracelular, una transmembrana o un dominio citoplásmico o membrana citoplasmática de una proteína de la invención. En una modalidad particularmente preferida, los anticuerpos sustancialmente purificados de la invención se unen específicamente con una secuencia secretada o un dominio extracelular de las secuencias de aminoácidos de una proteína de la invención. En una modalidad más preferida, los anticuerpos sustancialmente purificados de la invención se unen específicamente a una secuencia secretada o un dominio extracelular de las secuencias de aminoácidos de una proteína marcadora.

Un anticuerpo dirigido contra una proteína de la invención se puede utilizar para aislar la proteína mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Más aún, dicho anticuerpo se puede utilizar para detectar la proteína marcadora o fragmento de la misma (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar el nivel y el patrón de expresión del marcador. Los anticuerpos también se pueden utilizar de forma diagnóstica para monitorear los niveles de proteína en los tejidos o fluidos corporales (por ejemplo, en fluido corporal asociado al sarcoma) como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar por el uso de un derivado de anticuerpo, que comprende un anticuerpo de la invención acoplado a una sustancia detectable.

Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas

incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/ biotina y avidina/ biotina; ejemplos de adecuados materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuatorina, y ejemplos de material radioactivo adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

10 Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar como agentes terapéuticos en el tratamiento de cánceres. En una modalidad preferida, los anticuerpos completamente humanos de la invención se utilizan para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos con cáncer, particularmente aquellos que tiene un cáncer. En otra modalidad preferida, los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína marcadora o fragmento de la misma se utilizan para el tratamiento terapéutico. Adicionalmente, tal anticuerpo terapéutico puede ser un derivado de anticuerpo o inmunotoxina que comprende un anticuerpo conjugado con una fracción terapéutica tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo. Una agente citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo tioepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-imitadores (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

35

Los anticuerpos conjugados de la invención se puede utilizar para modificar una respuesta biológica dada, para el grupo funcional del fármaco no se debe interpretar como limitado a los agentes químicos terapéuticos clásicos. Por

ejemplo, el grupo funcional del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como proteína que inhibe ribosoma (véase Better et al., Patente Estadounidense No. 6, 146,631, cuya descripción se incorpora aquí en su totalidad), abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, alfa-Interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, la interleucina 1-("IL-1"), la interleucina-2 ("IL-2"), la interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias macrófaga de granulocitos ("M-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales grupos funcionales terapéuticos son bien conocidos, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona anticuerpos sustancialmente purificados, fragmentos de anticuerpo y derivados, todos los cuales se unen específicamente a una proteína de la invención y preferiblemente, una proteína marcadora. En varias modalidades, los anticuerpos sustancialmente purificados de la invención, o fragmentos o derivados de los mismos, pueden ser anticuerpos humanos, no humanos, quimérico y/o anticuerpos humanizados. En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos no humanos, fragmentos de anticuerpo y derivados, todos los cuales se unen específicamente a una proteína de la invención y preferiblemente, una proteína marcadora. Tales anticuerpos no humanos pueden ser anticuerpos de cabra, ratón, ovejas, caballo, pollo, conejo o rata. Alternativamente, los anticuerpos no

humanos de la invención pueden ser anticuerpos quiméricos y/o humanizados. Adicionalmente, los anticuerpos no humanos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. En aún un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo y derivados, todos los cuales se unen específicamente a una proteína de la invención y preferiblemente, una proteína marcadora. Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos y/o no-humanos.

La invención también proporciona un equipo que contiene un anticuerpo de la invención conjugado a una sustancia detectable, e instrucciones para uso. Todavía otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención. En una modalidad, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

3. Medicina Predictiva

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina predictiva en la que los ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica y ensayos clínicos de monitoreo se utilizan para propósitos de pronóstico (predicción) para de este modo tratar profilácticamente un individuo. De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención se relaciona con ensayos diagnósticos para determinar el nivel de expresión de una o más proteínas marcadoras o ácidos nucleicos, a fin de determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un sarcoma. Tales ensayos pueden ser utilizados con propósitos de pronóstico o predictivo para de esta manera tratar profilácticamente a un individuo antes de la aparición de la enfermedad.

Sin embargo, otro aspecto de la invención se relaciona con monitorear la influencia de los agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos administrados ya sea para inhibir un sarcoma o para tratar o prevenir cualquier otro trastorno (es decir, con el fin de comprender los efectos carcinogénicos que tal tratamiento puede tener) sobre la expresión o la actividad de un marcador de la invención en ensayos clínicos. Estos y otros agentes se describen en mayor detalle en las siguientes secciones.

A. Ensayos Diagnósticos

Un método de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de una proteína marcadora o ácido nucleico en una muestra biológica consiste en obtener una muestra biológica (por ejemplo, asociada al sarcoma de líquido corporal o muestra de tejido) a partir de un sujeto de prueba y en contacto la muestra biológica con un compuesto o una agente capaz de detectar el ácido nucleico o polipéptido (por ejemplo, mRNA, ADN genómico, o cADN). Los métodos de detección de la invención así se puede utilizar para detectar ARN, proteína, ADNc, ADN genómico o, por ejemplo, en una muestra biológica in vitro así como in vivo.

Por ejemplo, en técnicas in vitro para la detección de mRNA incluyen hibridaciones Northern y en hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para la detección de una proteína marcadora incluyen ensayo de inmunoabsorbente ligado A enzima (ELISA), Western blots, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. En las técnicas in vitro para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern. En las técnicas in vivo para la detección de mRNA incluye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones del Norte e hibridaciones in situ. Adicionalmente, las técnicas in vivo para la detección de una proteína marcadora incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o fragmento de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo se puede etiquetar con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de imagen estándar.

Un principio general de dichos ensayos de diagnóstico y pronóstico implica la preparación de una muestra o mezcla de reacción que puede contener un marcador, y una sonda, bajo condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el marcador y la sonda interactúen y se unan, formando así un complejo que puede ser retirado y/o detectadas en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden realizarse en una variedad de maneras.

Por ejemplo, un método para llevar a cabo tal un ensayo implicaría anclar el marcador o la sonda sobre un soporte en fase sólida, también referido como un sustrato, y detectar marcadores objetivo/ sonda complejos anclados en la fase sólida al final de la reacción. En modalidad de dicho método, una muestra de un sujeto, que se va a ensayar para detectar la presencia y o concentración del marcador, se puede anclar sobre un portador o soporte en fase sólida. En otra modalidad, la situación inversa es posible, en la que la sonda se puede anclar a una fase sólida y se puede permitir que una muestra de un sujeto reaccione como un componente sin anclar del ensayo.

Hay muchos métodos establecidos para anclar componentes del ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación moléculas, marcadores o sonda que se inmovilizan través de la conjugación de biotina y estreptavidina. Tales componentes del ensayo biotinilados se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas conocidas en el arte (por ejemplo, equipo de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizados en placas de 96 pozos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). En ciertas modalidades, las superficies con componentes del ensayo inmovilizadas se pueden preparar con antelación y almacenar.

Otros portadores adecuados o soportes de fase sólida para tales ensayos incluyen cualquier material capaz de unirse a la clase de molécula a la que el marcador o la sonda pertenecen. Soportes o portadores bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, poliestireno, nylon, polipropileno, nylon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita

Con el fin de llevar a cabo ensayos con los métodos anteriormente mencionados, el componente no inmovilizado se agrega a la fase sólida sobre la que está anclado el segundo componente. Después que se completa la reacción, los componentes no acomplexados se pueden eliminar (por ejemplo, por lavado), bajo condiciones tales que cualesquiera complejos formados permanecerán inmovilizados sobre la fase sólida. La detección de los complejos de marcadores/sonda anclados a la fase sólida se puede realizar en un número de métodos descritos aquí.

En una modalidad preferida, la sonda, cuando es el componente de ensayo desanclado, se puede etiquetar con el propósito de detección y lectura del ensayo, ya sea directamente o indirectamente, con etiquetas detectables discutidas aquí y que son bien conocidos para un experto en la técnica.

También es posible detectar directamente la formación de complejos marcador/sonda sin manipulación adicional o etiquetado de cualquiera de los componentes (marcador o sonda), por ejemplo al utilizar la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (véase, por ejemplo, Lakowicz et al, Patente Estadounidense No. 5,631,169; Stavrianopoulos, et al, Patente Estadounidense No. 4,868,103). Una etiqueta de fluoróforo en la primera

molécula, 'donante' se selecciona de tal manera que, tras la excitación con luz incidente de longitud de onda apropiada, su energía fluorescente emitida sea absorbida por un marcador fluorescente en una segunda molécula 'aceptora', que a su vez es capaz de fluorescencia debido a la energía absorbida.

5 Alternativamente, la molécula de proteína "donante" puede utilizar simplemente la energía natural fluorescente de los residuos de triptófano. Se escogen etiquetas que emitan diferentes longitudes de onda de luz, de tal manera que la etiqueta de molécula "aceptora" se pueda diferenciar de la del "donante". Debido a que la eficiencia de transferencia de energía entre las etiquetas está relacionada con la
10 distancia que separa las moléculas, las relaciones espaciales entre las moléculas se pueden evaluar. En una situación en la que ocurre la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de molécula 'aceptora' en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión FET se puede medir convenientemente a través de medios de detección fluorométrica estándar bien conocidos en la técnica (por
15 ejemplo, utilizando un fluorímetro).

En otra modalidad, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un marcador se puede lograr sin etiquetar ninguno de los componentes del ensayo (sonda o marcador) al utilizar una tecnología, tales como Análisis de
20 Interacción Biomolecular en Tiempo Real (MID) (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C, 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo y col, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Como se utiliza aquí, "BIA" o "resonancia de plasmones de superficie" es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Los
25 cambios en la masa en la superficie de unión (indicativa de un evento de unión) resulta en alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmones superficiales (SPR)), que resulta en una señal detectable que se puede utilizar como una indicación reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

30

Alternativamente, en otra modalidad, ensayos análogos de diagnóstico y pronóstico se pueden llevar a cabo con el marcador y la sonda como solutos en una fase líquida. En al un ensayo, la sonda y el marcador complejo se separan de los componentes no complejados mediante cualquier número de técnicas
35 estándar, que incluyen pero no se limitan a: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, los marcadores/ sonda complejos se pueden separar de los componentes de ensayo no complejados a través de una serie de etapas

centrífugas, debido al equilibrio de sedimentación diferente de los complejos en base a sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas, G., y Minton, AP, 1993, *Trends Biochem Sci.* 18 (8):284-7). También se pueden utilizar técnicas cromatográficas estándar para separar las moléculas de los complejos no complejados. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa las moléculas con base en el tamaño, y a través de la utilización de una resina de filtración en gel apropiada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande puede separar de los componentes no complejados relativamente pequeños. De manera similar, las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo marcador/ sonda cuando se compara con los componentes no complejados puede ser explotado para diferenciar el complejo a partir de componentes no complejados, por ejemplo, a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Tales resinas y técnicas cromatográficas son bien conocidas por un experto en el arte (véase, por ejemplo, Heegaard, N.H., 1998, *J. Mol. Recognit.* Winter 11(1-6): 141-8; Hage, D.S., y Tweed, S.A. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Oct 10;699(1-2):499-525). La electroforesis en gel también se puede emplear para separar componentes de ensayo complejados de componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteínas o de ácidos nucleicos se separan en base al tamaño o carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el proceso de electroforesis, se prefiere típicamente materiales matriz de gel no desnaturizantes y condiciones en ausencia de agente reductor. Las condiciones apropiadas para el ensayo particular y sus componentes serán bien conocidos por un experto en la técnica.

En una modalidad particular, el nivel de marcador mRNA se puede determinar en formatos in situ e in vitro en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" está destinado a incluir tejidos, células, fluidos biológicos y los aislados de los mismos, aislados de un objeto, así como también tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión utilizan ARN aislado. Para los métodos in vitro, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se selecciona contra el aislamiento de mRNA se puede utilizar para la purificación de ARN de las células (véase, por ejemplo, Ausubel et al, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999).

Adicionalmente, grandes números de muestras de tejido se pueden procesar fácilmente utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de una etapa de Chomczynski (1989, Patente Estadounidense No. 4,843,155).

5

El mRNA aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de polimerasa y matrices de la sonda. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de mRNA implica poner en contacto el mRNA aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar al mRNA codificado por el gen que se va a detectar. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, una ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de menos de 7, 15, 30, 50, 100 250 o 500 nucleótidos en longitud y suficiente para hibridarse específicamente bajo condiciones estrictas a un mRNA o ADN genómico que codifica un marcador de la presente invención. Se describen aquí otras sondas adecuadas para uso en los ensayos diagnósticos de la invención. La hibridación de un mRNA con una sonda indica que se expresa el marcador en cuestión.

20

En un formato, el mRNA se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo al ejecutar el mRNA aislado sobre un gel de agarosa y transferir el mRNA a partir del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la sonda (s) se inmoviliza sobre una superficie sólida y el mRNA se pone en contacto con la sonda (s), por ejemplo, en una matriz chips de gen Affymetrix. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos conocidos para la detección de mRNA para uso en la detección del nivel de mRNA codificado por los marcadores de la presente invención.

25

30

35

Un método alternativo para determinar el nivel de marcador mRNA en una muestra implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, por RT-PCR (la modalidad experimental se establece en Mullis, 1987, Patente Estadounidense No. 4,683,202), reacción de cadena de ligasa (Barany, 1991, Proc Natl Acad Sci. USA., 88: 189-193), replicación de secuencia auto sostenida (Guatelli et al, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86: 1173-1177), Q-beta replicasa (Lizardi et al, 1988, Bio/ Technology 6: 1197), replicación de círculo rodante (Lizardi et al, Patente Estadounidense No. 5,854,033) o

cualquier otro método de amplificación del ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas. Como se usa aquí, cebadores de amplificación se define como un par de moléculas de ácidos nucleicos que pueden hibridar las regiones 5' o 3' de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o viceversa-) y contienen una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación tienen de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos in situ, el mRNA no necesita ser aislado antes de la detección. En tales métodos, una muestra de células o tejido se prepara/procesa utilizando métodos histológicos conocidos. La muestra luego se inmoviliza sobre un soporte, típicamente un portaobjetos, y después se pone en contacto con una sonda que se puede hibridar con el mRNA que codifica el marcador.

Como una alternativa a hacer determinaciones con base en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones se pueden basar en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizados al corregir el nivel de expresión absoluto de un marcador al comparar su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen de limpieza que se expresa de forma constitutiva. Los genes adecuados para la normalización incluyen los genes de limpieza tales como el gen de actina, o los genes específicos a células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra del paciente, con otra muestra, por ejemplo, una muestra no-cáncer, o entre muestras de diferentes fuentes.

Alternativamente, el nivel de expresión se puede proporcionar como un nivel de expresión relativa. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, el nivel de expresión del marcador se determina por 10 o más muestras de aislados de células normales en comparación con los de cáncer, preferiblemente 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión de la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión medio de

5 cada uno de los genes ensayados en el mayor número de muestras y se utiliza como un nivel de expresión de criterio base para el marcador. El nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de ensayo (nivel absoluto de expresión) luego se divide por el valor de expresión medio obtenido para dicho marcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativa.

10 Preferiblemente, las muestras utilizadas en la determinación de criterio base será de células no neoplásicas. La elección de la fuente de células depende de la utilización del nivel relativo de expresión. El uso de expresión encontrado en los tejidos normales como una puntuación de medio de expresión ayuda en la validación si el marcador ensayado es cáncer específico (versus células normales). Adicionalmente, a medida que se acumulan más datos, se puede revisar el valor promedio de expresión, proporcionando mejores valores de expresión relativos con base en los datos acumulados. Los datos de expresión de células de cáncer proporcionan un medio para clasificar la gravedad del estado de cáncer.

20 En otra modalidad de la presente invención, se detecta una proteína marcadora. Un agente preferido para la detección de proteína marcadora de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a una proteína o un fragmento de la misma, preferiblemente un anticuerpo con un etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento o un derivado del mismo (por ejemplo, Fab o F (ab')₂). El término "etiquetado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, se pretende que abarque el etiquetado directo de la sonda o el anticuerpo al acoplar (es decir, físicamente ligado) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está directamente etiquetado. Ejemplos de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia y etiquetado finalmente con una sonda de ADN con biotina de tal manera puede ser detectado con estreptavidina marcada con fluorescencia.

35 Las proteínas de las células se pueden aislar mediante técnicas que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteínas empleadas pueden, por ejemplo, ser como aquellas descritas en Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Se puede emplear una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que une a un anticuerpo dado. Ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, el inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis Western blot y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteína/ anticuerpo conocidos para su uso en la para determinar si las células expresan un marcador de la presente invención.

En un formato se pueden utilizar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o derivados en métodos tales como Western blots o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, generalmente es preferible inmovilizar el anticuerpo o proteínas sobre un soporte sólido. Los soportes en fase sólida adecuados o portadores incluyen cualquier soporte capaz de unir a un antígeno o un anticuerpo. Soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita.

Un experto en la técnica conocerá muchos otros portadores adecuados para la unión del anticuerpo o antígeno, y será capaz de adaptar dicho soporte para su uso con la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de células neoplásicas se pueden ejecutar en una electroforesis en gel de poliacrilamida e inmovilizada sobre un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte se puede lavar con reguladores adecuados, seguido por tratamiento con el anticuerpo etiquetado detectablemente. El soporte en fase sólida se puede lavae con el regulador una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida sobre el soporte sólido luego se puede detectar por medios convencionales.

La invención abarca también equipos para detectar la presencia de una proteína marcadora o ácido nucleico en una muestra biológica. Tales equipos se pueden utilizar para determinar si un sujeto sufre de o está en riesgo incrementado de desarrollar sarcoma. Por ejemplo, el equipo puede comprender un compuesto etiquetado o agente capaz de detectar una proteína marcadora o ácido nucleico en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad de la proteína o el mARN de la muestra (por ejemplo, un anticuerpo que une la proteína o un fragmento de la misma, o una sonda de oligonucleótidos, que se une al ADN o

mARN que codifica la proteína). Los equipos también pueden incluir las instrucciones para interpretar los resultados obtenidos con el equipo.

Para los equipos basados en anticuerpos, el equipo puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, adherido a un soporte sólido) que se une a una proteína marcadora, y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente, que se une ya sea a la proteína o al primer anticuerpo y se conjuga con una etiqueta detectable.

Para los equipos con base en oligonucleótidos, el equipo puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido etiquetado detectablemente, que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína marcadora o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico marcador. El equipo también puede comprender, por ejemplo, un agente regulador, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. El equipo puede comprender adicionalmente componentes necesarios para detectar la etiqueta detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El equipo también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que se pueden ensayar y comparar con la muestra de prueba. Cada componente del equipo se puede encerrar dentro de un envase individual y todos los diversos contenedores pueden estar dentro de un único paquete, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados utilizando el equipo.

B. Farmacogenómica

Los marcadores de la invención también son útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se usa aquí, un "marcador farmacogenómico" es un marcador bioquímico objetivo cuyo nivel de expresión se correlaciona con una respuesta de fármaco clínica específica o susceptibilidad en un paciente (véase, por ejemplo, McLeod et al. (1999) *Eur. J. Cancer* 35 (12): 1650 - 1652). La presencia o la cantidad de la expresión de marcadores farmacogenómicos se relaciona con la respuesta predicha del paciente y, más particularmente del sarcoma del paciente a la terapia con un fármaco específico o clase de fármacos. Al evaluar la presencia o cantidad de la expresión de uno o más marcadores farmacogenómicos en un paciente, se puede seleccionar una terapia con fármacos como lo más apropiado para el paciente, o se predice que tendrá un mayor grado de éxito. Por ejemplo, con base en la presencia o la cantidad de ARN

o proteína codificada por marcadores de tumores específicos en un paciente, se puede seleccionar un fármaco o un tratamiento en curso que se optimiza para el tratamiento del tumor específico que probablemente está presente en el paciente. El uso de marcadores farmacogenómicos, por lo tanto permite seleccionar o
5 diseñar el tratamiento más adecuado para cada paciente con cáncer sin tratar diferentes fármacos o regímenes.

Otro aspecto de la farmacogenómica ofrece las condiciones genéticas que alteran la forma en que el cuerpo actúa contra los fármacos. Estas condiciones
10 farmacogenéticas puede ocurrir ya sea como defectos raros o como polimorfismos. Por ejemplo, la deficiencia en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía común hereditaria en la que la complicación clínica principal es la hemólisis después de ingestión de fármacos oxidantes (anti-malaria, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de habas.

Como una modalidad ilustrativa, la actividad de enzimas que metabolizan el fármaco es un determinante principal de la intensidad y duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de los polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan el fármaco (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas
20 del citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos de fármacos esperados o muestran una respuesta a fármaco exagerada y toxicidad grave después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizadores extensivos (EM) y
25 metabolizadores pobres (PM). La prevalencia de PM es diferente entre las distintas poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica para el CYP2D6 es altamente polimórfico y han sido identificadas varias mutaciones en PM, lo que lleva a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores pobres de CYP2D6 y CYP2C19 con bastante frecuencia experimentan exagerada respuesta a los
30 fármacos y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la fracción terapéutica activa, un PM no mostrará respuesta terapéutica, como se demuestra por el efecto analgésico de la codeína mediada por su morfina metabolito formado con CYP2D6. El otro extremo son los así llamados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a dosis estándar. Recientemente,
35 la base molecular del metabolismo ultra-rápido se ha identificado debido a la amplificación del gen CYP2D6.

Así, el nivel de expresión de un marcador de la invención en un individuo se puede determinar para seleccionar de esta manera agente (s) apropiado para el tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo. Adicionalmente, se pueden utilizar estudios farmacogenéticos para aplicar genotipo de alelos polimórficos que codifican enzimas que metabolizan fármacos para la identificación de un fenotipo sensible a fármaco de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la selección de la dosificación o el fármaco, puede evitar reacciones adversas o fallas terapéuticas y mejorar así la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un modulador de la expresión de un marcador de la invención.

C. Monitoreo de Ensayos Clínicos

Se puede aplicar el control a la influencia de los agentes (por ejemplo, compuestos de fármacos) sobre el nivel de expresión de un marcador de la invención no sólo en la detección de fármacos básicos, sino también en los ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar la expresión marcador se puede monitorear en ensayos clínicos de los sujetos que reciben tratamiento para un sarcoma. En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un método para monitorear la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteínas, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro candidato fármaco) que comprende el etapas de (i) obtener una muestra pre-administración de un sujeto antes de la administración del agente, (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores seleccionados de la invención en la muestra pre-administración, (iii) obtener una o más muestras post-administración del sujeto, iv) detectar el nivel de expresión del marcador (s) en las muestras post-administración, v) comparar el nivel de expresión del marcador (s) en la muestra pre-administración con el nivel de expresión del marcador (s) en la muestra o muestras post-administración, y (vi) alterar la administración del agente al sujeto de acuerdo con lo anterior. Por ejemplo, la expresión aumentada del gen marcador (s) durante el curso del tratamiento puede indicar dosis ineficaz y el deseo de aumentar la dosis. A la inversa, la expresión disminuida del gen marcador (s) puede indicar el tratamiento eficaz y sin necesidad de cambiar la dosis.

D. Matrices

La invención también incluye una matriz que comprende un marcador de la presente invención. La matriz se puede utilizar para ensayar la expresión de uno o más genes en la matriz. En una modalidad, la matriz se puede utilizar para ensayar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad tisular de los genes de la matriz. De esta manera, hasta aproximadamente 7600 genes se pueden ensayar simultáneamente para la expresión. Esto permite un perfil que se desarrolla mostrando una batería de genes expresados específicamente en uno o más tejidos.

Adicionalmente a tal determinación cualitativa, la invención permite la cuantificación de la expresión génica. Así, es determinable no sólo la especificidad tisular, sino también el nivel de expresión de una batería de genes en el tejido. Así, los genes se pueden agrupar sobre la base de su expresión de tejido per se y el nivel de expresión en ese tejido. Esto es útil, por ejemplo, en la determinación de la relación de la expresión génica entre dos o más tejidos. Así, se puede perturbar un tejido y se puede determinar el efecto sobre la expresión génica en un segundo tejido. En este contexto, se puede determinar el efecto de un tipo de célula sobre otro tipo de célula en respuesta a un estímulo biológico. Tal determinación es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula en el nivel de expresión de genes. Si un agente se administra para tratar terapéuticamente un tipo de células, pero tiene un efecto indeseable sobre otro tipo de células, la invención proporciona un ensayo para determinar la base molecular de los efectos indeseables y así proporciona la oportunidad de co-administrar un agente que contrarresta trata de otra manera el efecto no deseado. Del mismo modo, incluso dentro de un solo tipo de células, se pueden determinar los efectos biológicos indeseables a nivel molecular. Así, los efectos de un agente sobre la expresión de otro diferente al gen objetivo se puede comprobar y contrarrestar.

En otra modalidad, se puede utilizar la matriz para monitorear el curso del tiempo de la expresión de uno o más genes de la matriz. Esto puede ocurrir en diferentes contextos biológicos, como se describe aquí, por ejemplo el desarrollo de sarcoma, la progresión del sarcoma, y procesos, tal transformación celular asociado con el sarcoma.

La matriz también es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen sobre la expresión de otros genes en la misma célula o en células diferentes. Esto proporciona, por ejemplo, para una selección de objetivos moleculares

alternos para la intervención terapéutica si no se puede regular el objetivo final o en dirección 3'.

La matriz también es útil para determinar los patrones de expresión diferencial de uno o más genes en las células normales y anormales. Esto proporciona una batería de genes que podrían servir como un objetivo molecular para el diagnóstico o intervención terapéutica.

VII. Métodos de obtención de muestras

Las muestras útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier tejido, célula, biopsia o muestra de fluido corporal que expresa un marcador de la invención. En una modalidad, una muestra puede ser un tejido, una célula, sangre completa, suero, plasma, raspadura bucal, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, heces o lavado broncoalveolar. En modalidades preferidas, la muestra de tejido es una muestra del sarcoma.

Se pueden obtener muestras corporales de un sujeto mediante una variedad de técnicas conocidas en el arte, que incluyen, por ejemplo, mediante el uso de una biopsia o raspando o frotando un área o mediante el uso de una aguja para aspirar fluidos corporales. Los métodos para la recolección de varias muestras corporales son bien conocidos en la técnica.

Las muestras de tejido adecuadas para detectar y cuantificar un marcador de la invención pueden ser frescas, congelados o fijarse de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la técnica. Las muestras adecuadas de tejido preferiblemente se seccionan y se colocan en un portaobjetos de microscopio para análisis adicional. Alternativamente, las muestras sólidas, es decir, muestras de tejidos, se pueden solubilizar y/o homogenizar y posteriormente analizar como extractos solubles.

En una modalidad, una muestra de biopsia recién obtenida se congela utilizando, por ejemplo, nitrógeno líquido o difluorodichlorometano. La muestra congelada se monta para seccionar utilizando, por ejemplo, OCT, y serialmente se secciona en un criostato. Las secciones se recolectan en un portaobjetos de vidrio. Para tñido inmunohistoquímico los portaobjetos se pueden cubrir con, por ejemplo, cromo-alúmina, gelatina o poli-L-lisina para asegurar que las secciones se adhieren a los portaobjetos. En otra modalidad, las muestras se fijan y

embeben antes de seccionar. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede fijar en, por ejemplo, formalina, se deshidrata y embebe serialmente en, por ejemplo, parafina.

- 5 Una vez se obtiene la muestra se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica por ser adecuado para detectar y cuantificar un marcador de la invención (ya sea en el nivel de ácido nucleico o proteína). Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen pero no se limitan a western blots, northern blots, southern blots, inmunohistoquímica, ELISA, por ejemplo ELISA amplificada, 10 inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, análisis espectrométrico de masas, por ejemplo, MALDI- TOF y SELDI-TOF, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En modalidades particulares, se detecta la expresión de un marcador de la invención sobre un nivel 15 de proteína utilizando, por ejemplo, los anticuerpos que se unen específicamente estas proteínas.

- Se pueden necesitar muestras que se modifiquen con el fin de hacer un marcador de la invención accesible a unión de anticuerpos. En un aspecto 20 particular de los métodos de inmunocitoquímica o inmunohistoquímica, los portaobjetos se pueden transferir a un regulador de pretratamiento y, opcionalmente, se calientan para aumentar la accesibilidad a antígeno. El calentamiento de la muestra en el regulador de pretratamiento rápidamente interrumpe la bicapa lipídica de las células y hace los antígenos (puede ser el caso 25 de especímenes frescos, pero no típicamente lo que ocurre en los especímenes fijados) más accesibles para la unión a anticuerpo. Los términos "regulador de pretratamiento" y "regulador de preparación" se utilizan aquí de forma intercambiable para referirse a un regulador que se utiliza para preparar las muestras citológicas e histológicas para inmunoteñido, particularmente al 30 incrementar la accesibilidad de un marcador de la invención para la unión del anticuerpo. El regulador de pretratamiento puede comprender una solución de sal de pH específico, un polímero, un detergente o un tensoactivo no iónico o aniónico, tal como, por ejemplo, un tensoactivo aniónico o no iónico etiloxilado, un alcanato o un alcóxido o incluso mezclas de estos tensoactivos o incluso el 35 uso de una sal biliar. El regulador de pretratamiento puede, por ejemplo, ser una solución de 0,1% a 1% de ácido desoxicólico, sal de sodio, o una solución de laurth-13-carboxilato de sodio (por ejemplo, Sandopan LS) o complejo aniónico

etoxilado. En algunas modalidades, el regulador de pretratamiento se puede utilizar también como un regulador de almacenamiento para portaobjetos.

Se puede utilizar cualquier método para fabricar proteínas marcadoras de la invención que sea más accesible a la unión de anticuerpos en la práctica de la invención, que incluyen los métodos de recuperación de antígeno conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bibbo, et al. (2002) *Acta. Cytol.* 46:25-29; Saqi, et al. (2003) *Diagn. Cytopathol.* 27:365-370; Bibbo, et al. (2003) *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 25:8-11, el contenido de cada una se incorpora aquí por referencia.

Luego de pretratamiento para aumentar la accesibilidad de la proteína marcadora, se pueden bloquear las muestras con un agente bloqueante apropiado, por ejemplo, un reactivo de peroxidasa de bloqueo tal como peróxido de hidrógeno. En algunas modalidades, las muestras se pueden bloquear utilizando un reactivo de proteína de bloqueo para prevenir la unión no específica de los anticuerpos. El reactivo de proteína de bloqueo puede comprender, por ejemplo, caseína purificada. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a un marcador de la invención luego se incuba con la muestra. Un experto en la técnica apreciará que se pueden obtener uno más pronósticos o diagnósticos exactos en algunos casos al detectar múltiples epítomos en una proteína marcadora de la invención en una muestra del paciente. Por lo tanto, en modalidades particulares, se utilizan por lo menos dos anticuerpos dirigidos a epítomos diferentes de un marcador de la invención. Cuando se utiliza más de un anticuerpo, estos anticuerpos se pueden agregar a una sola muestra de forma secuencial como reactivos de anticuerpos individuales o simultáneamente como un cóctel de anticuerpos. Alternativamente, cada anticuerpo individual se puede agregar a una muestra separada del mismo paciente, y se agrupan los datos resultantes.

Las técnicas para detectar la unión de anticuerpos son bien conocidas en el arte. La unión del anticuerpo a un marcador de la invención se puede detectar a través del uso de reactivos químicos que generan una señal detectable que corresponde al nivel de unión de anticuerpos y, de acuerdo con lo anterior, al nivel de expresión de la proteína marcadora. En uno de los métodos inmunohistoquímicos o inmunocitoquímicos de la invención, la unión del anticuerpo se detecta a través del uso de un anticuerpo secundario que se conjuga con un polímero etiquetado. Ejemplos de polímeros etiquetados incluyen pero no se limitan a conjugados de polímero enzima- polímero. Las enzimas en

estos complejos se utilizan típicamente para catalizar la precipitación de un cromógeno en el sitio de unión antígeno-anticuerpo, lo que resulta en el teñido de células que corresponde al nivel de expresión del biomarcador de interés. Las enzimas de interés particular incluyen, pero no se limitan a, la peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (AP).

En un método de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica particular de la invención, la unión del anticuerpo a un marcador de la invención se detecta a través del uso de un polímero etiquetado con HRP que se conjuga con un anticuerpo secundario. La unión de anticuerpo también se puede detectar a través del uso de un reactivo de sonda específico a especie, que se une a los anticuerpos monoclonales o policlonales, y un polímero conjugado con HRP, que se une al reactivo e sonda específico a especies. Los portaobjetos se tiñen para la unión de anticuerpos utilizando cualquier cromógeno, por ejemplo, el cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) y, a continuación se contratiñen con hematoxilina y, opcionalmente, un agente azulado tal como hidróxido de amonio o TBS/Tween-20. Otros cromógenos adecuados incluyen, por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). En algunos aspectos de la invención, se revisan los portaobjetos microscópicamente por un citólogo y/o un patólogo para evaluar la tinción de células, por ejemplo, la tinción fluorescente (es decir, marcador de expresión). Alternativamente, las muestras se pueden examinar mediante microscopía automatizada o por personal con la ayuda de software de computador que facilita la identificación de células con teñido positivo.

La detección de unión de anticuerpos se puede facilitar mediante el acoplamiento de los anticuerpos anti-marcadores a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos adecuados de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales adecuados fluorescentes incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferina, luciferasa, y aequorin, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H .

En una modalidad de la invención se preparan muestras congeladas como se describió anteriormente y se tiñen posteriormente con anticuerpos contra un marcador de la invención diluido a una concentración apropiada utilizando, por ejemplo, Tris-solución salina regulada (TBS). Los anticuerpos primarios pueden ser detectados al incubar los portaobjetos anti-inmunoglobulinas en biotiniladas. Esta señal opcionalmente se puede amplificar y visualizar utilizando precipitación de diaminobencidina del antígeno. Adicionalmente, los portaobjetos e pueden contrateñir opcionalmente con, por ejemplo, hematoxilina, para visualizar las células.

En otra modalidad, las muestras fija y embebidas se tiñen con anticuerpos contra un marcador de la invención y contrateñido como se describió anteriormente para las secciones congeladas. Adicionalmente, se pueden obtener muestras opcionalmente tratadas con agentes para amplificar la señal con el fin de visualizar el teñido de anticuerpos. Por ejemplo, se puede utilizar una precipitación catalizada con peroxidasa de biotinil-tyramida, que a su vez se hace reaccionar con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sistema de Amplificación la Señal Catalizada (CSA), Dako, Carpinteria, CA).

Los ensayos con base en tejidos (es decir, inmunohistoquímica) son los métodos preferidos para detectar y cuantificar un marcador de la invención. En una modalidad, la presencia o ausencia de un marcador de la invención se puede determinar por inmunohistoquímica. En una modalidad, el análisis inmunohistoquímico utiliza bajas concentraciones de un anticuerpo anti-marcador de tal manera que las células que carecen del marcador no se tiñen. En otra modalidad, la presencia o ausencia de un marcador de la invención se determina utilizando un método inmunohistoquímico que utiliza altas concentraciones de un anticuerpo anti-marcador de tal manera que las células que carecen de la proteína marcadora mancha fuertemente. Las células que no se manchan contiene marcador mutado y no producen proteína marcadora antigénicamente reconocible, o son células en las que las rutas que regulan los niveles de marcadores se desregulan, resultando en expresión de estado estacionario de proteína marcadora insignificante.

Un experto en la técnica reconocerá que la concentración de un anticuerpo particular utilizado para practicar los métodos de la invención variará dependiendo de factores tales como el tiempo para el nivel de unión, de especificidad del anticuerpo para un marcador de la invención, y el método de preparación de la

muestra. Más aún, cuando se utilizan anticuerpos múltiples, la concentración requerida se puede afectar por el orden en que los anticuerpos se aplican a la muestra, por ejemplo, al mismo tiempo como un cóctel o secuencialmente como reactivos de anticuerpos individuales. Adicionalmente, la química de detección
5 utilizada para visualizar la unión del anticuerpo a un marcador de la invención también se debe ser optimizar para producir la relación señal a ruido deseada.

En una modalidad de la invención, los métodos proteómicos, por ejemplo, espectrometría de masas, se utilizan para detectar y cuantificar las proteínas
10 marcadoras de la invención. Por ejemplo, espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) o de Masas en Tiempo de Vuelo mediante Desabsorción/Ionización por Láser de Superficie Mejorado (SELDI-TOF MS), que involucra la aplicación de un muestra biológica, tal como suero, a un chip de unión
15 a proteína chip (Wright, G.L., Jr., *et al.* (2002) *Expert Rev Mol Diagn* 2:549; Li, J., *et al.* (2002) *Clin Chem* 48: 1296; Laronga, C, *et al.* (2003) *Dis Markers* 19:229; Petricoin, E.F., *et al.* (2002) 359:572; Adam, B.L., *et al.* (2002) *Cancer Res* 62:3609; Tolson, J., *et al.* (2004) *Lab Invest* 84:845; Xiao, Z., *et al.* (2001) *Cancer Res* 61:6029) se puede utilizar para detectar y cuantificar las proteínas PY-SHC
20 y/o p66 Shc-. Se describen métodos espectrométricos de masa en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5.622,824, 5.605,798 y 5.547,835, los contenidos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

En otras modalidades, la expresión de un marcador de la invención se
25 detecta en el nivel de ácido nucleico. Las técnicas con base en ácidos nucleicos para evaluar la expresión son bien conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, determinar el nivel de marcador mRNA en una muestra de un sujeto. Hay muchos métodos de detección de expresión que utilizan ARN aislado. Cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se selecciona contra el aislamiento de mRNA se
30 puede utilizar para la purificación de ARN de las células que expresan un marcador de la invención (véase, por ejemplo, Ausubel y col., Ed., (1987-1999) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Nueva York). Adicionalmente, un gran número de muestras de tejido se pueden procesar fácilmente utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte, tal como,
35 por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de única etapa de Chomczynski (1989, Patente Estadounidense No. 4,843,155).

El término "sonda" se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse selectivamente a un marcador de la invención, por ejemplo, una transcripción de nucleótido y/o proteína. Las sondas se pueden sintetizar por un experto en la técnica o derivar de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas se pueden
5 diseñar específicamente para ser etiquetadas. Ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, y las moléculas orgánicas.

El mRNA aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o de
10 amplificación que incluyen, pero no se limitan a, los análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de polimerasa y matrices de la sonda. Un método para la detección de los niveles de mRNA implica poner en contacto el mRNA aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que pueda hibridar con el mRNA marcador. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un cADN de
15 longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de por lo menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos en longitud y suficiente para hibridarse específicamente bajo condiciones estrictas a ADN genómico marcador.

En una modalidad, el mRNA se inmoviliza sobre una superficie sólida y se
20 pone en contacto con una sonda, por ejemplo al ejecutar el mRNA aislado en un gel de agarosa y transferir el mRNA a partir del gel a una membrana, tales como nitrocelulosa. En una modalidad alternativa, la sonda (s) se inmoviliza sobre una superficie y el mRNA se pone en contacto con la sonda (s), por ejemplo en una matriz de chips de gen Affymetrix. Un experto en la técnica puede adaptar
25 fácilmente los métodos de detección de mRNA conocidos para su uso en la detección del nivel de mRNA marcador.

Un método alternativo para determinar el nivel de mRNA marcador en una muestra implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, por
30 RT-PCR (la modalidad experimental se establece en Mullis, 1987, Patente de Estadounidense No. 4,683,202), la reacción de cadena de la ligasa (Barany (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 189-193), la replicación de secuencia auto sostenida (Guatelli et al (1990). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:
35 1173-1177), Q-beta replicasa (Lizardi et al (1988) *Bio/Technology* 6: 1.197), replicación círculo de enrollado (Lizardi et al., Patente de Estadounidense No. 5.854,033) o cualquier otro método de amplificación del ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas

por los expertos en el arte. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas. En aspectos particulares de la invención, la expresión marcador se evalúa por RT-PCR fluorogénico cuantitativo (es decir, el

5 TaqMan TM System). Tales métodos utilizan típicamente pares de cebadores de oligonucleótidos que son específicos s un marcador de la invención. Los métodos para diseñar cebadores de oligonucleótidos específicos para una secuencia conocida son bien conocidos en la técnica.

10 Los niveles de expresión de un marcador de la invención se pueden monitorear utilizando una transferencia de membrana (tal como se utiliza en el análisis de hibridación, tales como Northern, Southern, dot, y similares), o micropozos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprende ácidos nucleicos enlazados). Véase Patentes Estadounidenses

15 Nos. 5.770,722, 5.874,219, 5.744,305, 5.677,195 y 5.445,934 que se incorporan aquí como referencia. La detección de expresión de marcador pueden comprender también el uso de sondas de ácidos nucleicos en solución.

En una modalidad de la invención, se utilizan micromatrices para detectar la

20 expresión de un marcador de la invención. Las micromatrices son especialmente adecuadas para este propósito debido a la reproducibilidad entre diferentes experimentos. Las micromatrices de ADN proporcionan un método para la medición simultánea de los niveles de expresión de un gran número de genes. Cada matriz consiste en un patrón reproducible de sondas de captura adheridas a

25 un soporte sólido. El ARN o ADN etiquetado se hibrida con sondas complementarias sobre la matriz y luego se detectan por un escáner láser. Se determinan intensidades de hibridación para cada sonda en la matriz y se convierte en un valor cuantitativo que representa los niveles relativos de expresión génica. Véase, Patentes Estadounidenses Nos . 6,040,138, 5.800,992 y

30 6,020,135, 6,033,860, y 6,344,316, que se incorporan aquí como referencia. Las matrices de alta densidad de oligonucleótidos son particularmente útiles para la determinación del perfil de expresión génica para un gran número de ARN en una muestra.

35 Las cantidades de marcador, y/o una relación matemática de las cantidades de un marcador de la invención se pueden utilizar para calcular el riesgo de recurrencia de un sarcoma en un sujeto que está siendo tratado por un sarcoma, la supervivencia de un sujeto que está siendo tratado para el sarcoma , si un

sarcoma es agresivo, la eficacia de un régimen de tratamiento para el tratamiento de un sarcoma, y similares, utilizando los métodos de la invención, que pueden incluir los métodos de análisis de regresión conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, los modelos de regresión adecuados incluyen, pero no se limitan a CART (por ejemplo, Hill, T, y Lewicki, P. (2006) "STATISTICS Methods and Applications" StatSoft, Tulsa, OK), Cox, Cox (por ejemplo, www.evidence-based-medicine.co.uk), exponencial, normal y log normal (por ejemplo, www.obgyn.cam.ac.uk/MRG/statsbook/stsurvan.html), logística (por ejemplo, www.en.wikipedia.org/wiki/Logistic_regression), paramétricos y no paramétricos, semi-paramétrico (por ejemplo, www.socserv.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion), lineal (por ejemplo, www.en.wikipedia.org/wiki/Linear_regression), o aditivos (por ejemplo, www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_model).

En una modalidad, un análisis de regresión incluye las cantidades de marcador. En otra modalidad, un análisis de regresión incluye una relación matemática del marcador. En todavía otra modalidad, un análisis de regresión de las cantidades de marcador, y/o una relación matemática del marcador puede incluir covariables clínicas adicionales y/o moleculares. Tales covariables clínicas incluyen, pero no se limitan a, estado ganglionar, estadio tumoral, grado tumoral, tamaño del tumor, régimen de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia y/o radioterapia, el resultado clínico (por ejemplo, recaída, supervivencia específica a enfermedad, fracaso de la terapia), y/o resultado clínico como una función del tiempo después del diagnóstico, tiempo después del inicio de la terapia, y/o el tiempo después de la terminación del tratamiento.

En otra modalidad, las cantidades de marcador, y/o una relación matemática de las cantidades de un marcador se pueden utilizar para calcular el riesgo de recurrencia de un sarcoma en un sujeto que está siendo tratado por un sarcoma, la supervivencia de un sujeto que está siendo tratado por un sarcoma, si un sarcoma es agresivo, la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar un sarcoma, y similares, utilizando los métodos de la invención, que pueden incluir los métodos de análisis de regresión conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, los modelos de regresión adecuados incluyen, pero no se limitan a CART (por ejemplo, Hill, T, y Lewicki, P. (2006) "STATISTICS Methods and Applications" StatSoft, Tulsa, OK), Cox, Cox (por ejemplo, www.evidence-based-medicine.co.uk), exponencial, normal y log normal (por ejemplo, www.obgyn.cam.ac.uk/MRG/statsbook/stsurvan.html), logística (por ejemplo,

www.en.wikipedia.org/wiki/Logistic_regression), paramétricoas y no paramétricos, semi-paramétrico (por ejemplo, www.socserv.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion), lineal (por ejemplo, www.en.wikipedia.org/wiki/Linear_regression), o aditivos (por ejemplo, 5 www.en.wikipedia.org/wiki/Generalized_additive_model).

En una modalidad, un análisis de regresión incluye las cantidades de marcador. En otra modalidad, un análisis de regresión incluye una relación matemática del marcador. En otra modalidad, un análisis de regresión de las 10 cantidades de marcador, y/o una relación matemática del marcador puede incluir covariables clínicas adicionales y/o moleculares. Estas covariables clínicas incluyen, pero no se limitan a, estado ganglionar, estadio tumoral, grado tumoral, tamaño del tumor, régimen de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia y/o radioterapia, el resultado clínico (por ejemplo, recaída, supervivencia específica a 15 la enfermedad, fracaso de la terapia), y/o los resultados clínicos como una función del tiempo después del diagnóstico, tiempo después del inicio de la terapia, y/o tiempo después de la finalización del tratamiento.

VIII. Equipos

20 La invención también proporciona composiciones y equipos para pronosticar un sarcoma, la recurrencia de un sarcoma, o la supervivencia de un sujeto que está siendo tratado por un sarcoma. Estos equipos incluyen uno o más de los siguientes: un anticuerpo detectable que se une específicamente a un 25 marcador de la invención, un anticuerpo detectable que se une específicamente a un marcador de la invención, reactivos para obtener y/o preparar muestras de tejidos de los sujetos para tñido, e instrucciones de uso.

Los equipos de la invención pueden comprender opcionalmente 30 componentes adicionales útiles para realizar los métodos de la invención. A modo de ejemplo, los equipos pueden comprender fluidos (por ejemplo, regulador SSC) adecuados para hibridar ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de muestra, un material de instrucción que describe el 35 desempeño de un método de la invención y controles/estándares específicos a tejidos.

IX. Ensayos de Selección

Los objetivos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los genes posteriormente enumerados en las Tablas 2-9 aquí. Con base en los resultados de los experimentos descritos aquí por los Solicitantes, las proteínas clave moduladas por Q10 se asocian con o se pueden clasificar en diferentes rutas o grupos de moléculas, que incluyen los componentes del citoesqueleto, factores de transcripción, respuesta apoptótica, ruta de pentosa fosfato, ruta biosintética, estrés oxidativo (pro-oxidante), alteraciones de membrana, metabolismo de fosforilación oxidativa.

De acuerdo con lo anterior, en una modalidad de la invención, un marcador puede incluir ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenita translocar ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa),

proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de
 5 retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasa 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR,
 10 GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2 y VEGFA.

Los ensayos de selección útiles para identificar moduladores de marcadores identificados se describen adelante.

15 La invención también proporciona métodos (también denominados aquí como "ensayos de selección") para identificar moduladores, *es decir*, compuestos candidatos o agentes (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, pequeñas moléculas u otros fármacos), que son útiles para tratar o prevenir un sarcoma al modular la expresión y/o actividad de un marcador de la
 20 invención. Tales ensayos comprenden típicamente una reacción entre un marcador de la invención y uno o más componentes del ensayo. Los otros componentes pueden ser ya sea el compuesto de prueba en sí, o una combinación de compuestos de prueba y un socio de unión natural de un marcador de la invención. Los compuestos identificados a través de ensayos tales
 25 como los descritos aquí pueden ser útiles, por ejemplo, para modular, por ejemplo, inhibir la agresividad, mejorar, tratar o prevenir un sarcoma.

Los compuestos de prueba utilizados en los ensayos de selección de la presente invención se pueden obtener de cualquier fuente disponible, que incluye
 30 bibliotecas sistemáticas de compuestos naturales y/o sintéticos. Los compuestos de prueba también se pueden obtener por cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de la colección combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con una estructura principal novedosa, no
 35 peptídica que son resistentes a la degradación enzimática, pero que no obstante son bioactivo; véase, por ejemplo, Zuckermann et al, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-85); bibliotecas en fase de solución o fase sólida en paralelo espacialmente direccionable; bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución;

el método de colección de "una perla de un compuesto" y métodos de bibliotecas sintéticas utilizando selección cromatografía de afinidad. La colección biológica y los métodos de colección peptoides se limitan a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro métodos son aplicables a los péptidos, oligómeros no peptídicos o las bibliotecas de moléculas pequeñas de los compuestos compuestos (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261: 1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en solución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Biotechniques* 13:412-421), o en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacterias y/o esporas, (Ladner, USP 5.223,409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1865-1869) o sobre fago (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner, *supra.*).

Los métodos de selección de la invención comprenden poner en contacto una célula con sarcoma de un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la expresión y/o actividad de un marcador de la invención en la célula. La expresión y/o actividad de un marcador de la invención puede determinarse como se describe aquí.

En otra modalidad, la invención proporciona ensayos para candidato de selección o compuestos de prueba que son sustratos de un marcador de la invención o porciones biológicamente activas de las mismas. En todavía otra modalidad, la invención proporciona ensayos para candidato de selección o compuestos de ensayo que se unen a un marcador de la invención o porciones biológicamente activos de los mismos. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse directamente a un marcador se puede lograr, por ejemplo, al acoplar el compuesto con un radioisótopo o etiqueta enzimática de tal manera que se puede determinar la unión del compuesto al marcador al detectar el compuesto marcador etiquetado en un complejo. Por ejemplo, los

compuestos (por ejemplo, sustratos marcadores) se pueden etiquetar con ^{131}I , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o H, ya sea directa o indirectamente, y el radioisótopo detectado por conteo directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Alternativamente, los componentes del ensayo se pueden etiquetar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y la etiqueta enzimática detectado mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado para producto.

Esta invención se relaciona adicionalmente con agentes novedosos identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente. De acuerdo con lo anterior, está dentro del alcance de esta invención el uso de más de un agente identificado como se describe aquí en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, un agente capaz de modular la expresión y/o actividad de un marcador de la invención identificado como se describe aquí se puede utilizar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente identificado como se describe aquí se puede utilizar en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Adicionalmente, esta invención se relaciona con los usos de nuevos agentes identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente para el tratamiento como se describe anteriormente.

X. Composiciones Farmacéuticas y Administración Farmacéutica

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10. Una molécula de CoQ10 se puede incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una molécula de CoQ10 y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualesquier disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de las sustancias auxiliares tales como agentes humectantes

o emulsionantes, conservantes o reguladores, que mejoran la vida útil o la efectividad del eficacia del influenciador de entorno.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semi-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, cremas, lociones, linimentos, ungüentos o pastas, gotas para la administración a los ojos, los oídos o la nariz, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica destinada.

Se pueden administrar las moléculas CoQ10, mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es tópica, inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa. Como se apreciará por el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo se puede preparar con un portador que se va a proteger contra el compuesto de liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son patentados o generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. En una modalidad, el modo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad, el influenciador de entorno se administra por infusión intravenosa o inyección. En otra modalidad, el influenciador de entorno se administra por inyección intramuscular o subcutánea. En una modalidad preferida, el influenciador de entorno se administra por vía tópica.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposomas, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, influenciado de entorno) en la cantidad requerida en

un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros

5 ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío, y secado por aspersión que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier

10 ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, a través del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante la inclusión en la composición un

15 agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las Técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Para administración sistémica, se prefiere la inyección, que incluye intramuscular,

20 intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones líquidas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Adicionalmente, los compuestos se pueden formular en forma sólida y se redisuelve o suspende inmediatamente antes de su uso. Se incluyen también

25 formas liofilizadas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como

30 agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno y calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón sódico), o agentes humectantes (por ejemplo, lauril

35 sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro

vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite ationd, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, metilo propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales reguladoras, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según sea apropiado.

10

Las preparaciones para administración oral pueden ser convenientemente formuladas para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional. Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

25

Los compuestos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, pirógenos estériles libre de agua, antes de su uso.

35

154
13

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

5 Adicionalmente a las formulaciones descritas previamente, los compuestos se pueden formular también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o

10 hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

La administración sistémica también puede ser por medio de transmucosa o

15 transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a ser permeadas en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa se pueden utilizar sales biliares y derivados de ácido fusídico, además, los detergentes para facilitar la penetración. La

20 administración de transmucosa puede ser a través de aerosoles nasales o utilizando supositorios. Para la administración tópica, el compuesto (s) de la invención se formula en forma de ungüentos, pomadas, geles o cremas, como se conocen generalmente en la técnica. Una solución de lavado se puede utilizar localmente para tratar una lesión o inflamación para acelerar la curación.

25 Las composiciones si se desea, se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El empaque puede comprender, por ejemplo lámina de metal o plástico, tal como un empaque blíster. El empaque o

30 dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración.

Para las terapias que implican la administración de ácidos nucleicos, el compuesto (s) de la invención se puede formular para una variedad de modos de

35 administración, que incluyen la administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Pharmaceutical Remington Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA Para la administración sistémica, se prefiere la inyección, que incluye intramuscular, intravenosa,

intraperitoneal intranodal, y subcutánea. Para la inyección, el compuesto (s) de la invención se pueden formular en soluciones líquidas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, el compuesto (s) se puede formular en forma sólida y se

5 redisuelve o suspende inmediatamente antes de uso. También están incluidos las formas liofilizadas.

En una modalidad preferida de la invención, las composiciones que comprenden una molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, se administran por vía

10 tópica. Es preferible presentar el ingrediente activo, es decir, una molécula de CoQ10, como una formulación farmacéutica. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20% p/p, por peso de la formulación en el producto final, aunque puede comprender hasta un 30% p/p, preferiblemente de

15 aproximadamente 1% a aproximadamente el 20% p/p de la formulación. Las formulaciones tópicas de la presente invención, comprenden un ingrediente activo junto con uno o más portadores aceptables (s) de los mismos y, opcionalmente, cualesquier otros ingredientes terapéuticos (s). El portador (s) debe ser "aceptables" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no

20 perjudiciales para el receptor de la misma.

En el tratamiento de un paciente que exhibe 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 aquella cantidad del

25 compuesto que se traduce en la mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente.

La toxicidad y eficacia terapéutica de estos compuestos se puede determinar por procedimientos farmacéuticos en cultivos celulares o en animales

30 experimentales, por ejemplo, para determinar el DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población) y el ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de

35 estos ensayos de cultivo de células y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad.

La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

5 Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un rango de concentración en plasma circulante que incluye el IC₅₀ como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en
10 plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC.

La formulación exacta, ruta de administración y la dosificación se puede elegir por el médico del individuo en vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo Fingl et al., in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Cap. 1 p.
15 1). Cabe señalar que el médico tratante sabe cómo y cuándo terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a la toxicidad, o disfunciones de órganos. Por el contrario, el médico tratante también sabría ajustar el tratamiento a los niveles más altos si la respuesta clínica no es la adecuada (que excluye la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno oncogénico de
20 interés variará con la gravedad de la afección a tratar y de la ruta de administración. La severidad de la condición, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por los métodos de evaluación pronóstico estándar. Adicionalmente, la dosis y la frecuencia de la dosis quizás, también variarán según la edad, peso corporal, y la respuesta del paciente individual. Un programa comparable al descrito
25 anteriormente puede ser utilizados en medicina veterinaria.

Dependiendo de las condiciones específicas que se tratan, tales agentes se pueden formular y administrar sistémicamente o localmente. Las técnicas para la formulación y la administración se puede encontrar en *Pharmaceutical Sciences*
30 de Remington, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Las rutas adecuadas pueden incluir administración oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa, o intestinal; administración parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea, inyecciones intramedular, así como intraventricular intratecal, directo, por vía intravenosa, inyección intraperitoneal, intranasal, o intraocular, por nombrar
35 sólo unos pocos.

Las composiciones descritas anteriormente se pueden administrar a un sujeto en cualquier formulación adecuada. Además del tratamiento de un sarcoma

con formulaciones tópicas de una molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, en otros aspectos de la invención podría ser una molécula de CoQ10 suministrada mediante otros métodos. Por ejemplo, una molécula de CoQ10 se podría formular para administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o inyección intratumoral. Otros métodos de suministro, por ejemplo, el suministro liposómico o difusión desde un dispositivo impregnado con la composición se podría utilizar. Las composiciones se pueden administrar en un bolo único, inyecciones múltiples, o mediante infusión continua (por ejemplo, por vía intravenosa o por diálisis peritoneal). Para la administración parenteral, las composiciones se formulan preferiblemente en una forma esterilizada libre de pirógenos. Las composiciones de la invención también se puede administrar in vitro a una célula (por ejemplo, para inducir la apoptosis en una célula neoplásica en un cultivo in vitro) al agregar simplemente la composición al fluido en el que la célula esta contenida.

Para la inyección, se pueden formular agentes de la invención en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, regulador de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosa tales, penetrantes apropiados para permear la barrera se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

El uso de portadores farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos aquí descritos para la práctica de la invención en dosificaciones adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la invención. Con la elección apropiada del portador y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente invención, en particular, aquellos formulados en forma de soluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos se pueden formular fácilmente utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones, y similares, para la ingestión oral de un paciente que se va a tratar.

Los agentes destinados a ser administrados intracelularmente se pueden administrar utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte. Por ejemplo, tales agentes se pueden encapsular en liposomas, luego se administran

158
157

como se ha descrito anteriormente. Los liposomas son bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación de liposomas se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales están protegidos del microentorno externo y, debido a liposomas fusibles con las membranas celulares, se suministran eficientemente en el citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, se pueden administrar pequeñas moléculas orgánicas directamente intracelularmente.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir su propósito pretendido. La determinación de las cantidades efectivas están bien dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada aquí contenida. Adicionalmente a los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas o soluciones. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar de una manera que es en sí misma conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levitación, emulsionantes, encapsulación, atrapando 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 donde se requiere tratamiento, tal como linimentos, lociones, cremas, ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para la administración a los ojos, oídos, o nariz. Las gotas de acuerdo con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas estériles o yse pueden preparar disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa apropiada de un agente bactericida y/o fungicidas y/o cualquier otro conservante adecuado, y preferiblemente que incluye una superficie de agente activo. La solución resultante se puede depurar y se esteriliza mediante filtración y se transfiere al recipiente por una técnica aséptica. Ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son nitrato o acetato de fenilmercúrico (0.002%), cloruro de benzalconio (0.01) y acetato de clorhexidina

(0.01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas
5 adecuadas para su aplicación a la piel o los ojos. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y se puede preparar por métodos similares a aquellos de la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación a la piel pueden incluir también un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tal como un
10 alcohol o acetona, y/o un humectante tal como glicerina o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

Las cremas, ungüentos o pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Se
15 pueden preparar mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, con la ayuda de un mecanismo apropiado, con una base grasa o sin grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; mucílago; un aceite de origen natural
20 tal como aceite de almendras, maíz, cacahuete, ricino o oliva, grasa de lana o sus derivados, o un ácido graso tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o macro geles de. La formulación puede incorporar cualquier agente de superficie activa adecuado tal como un activo de superficie aniónico, catiónico o no iónico activo, tal como ésteres de sorbitán o derivados de polioxietileno de los mismos. Los agentes de suspensión tales como gomas
25 naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices síliceas, y otros ingredientes tales como lanolina, también se pueden incluir.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen
30 soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar las suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas.

Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos
35 tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano. Opcionalmente, la suspensión

puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

5 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener al combinar los compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente al moler una mezcla resultante, y procesar la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como
10 azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinil pirrolidona (PVP). Si se desea, los agentes disgregantes se pueden agregar, tal como la
15 polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimiento adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar, que
20 opcionalmente pueden contener goma Arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o los revestimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

25 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tales como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos mezclados con
30 relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Adicionalmente, se pueden agregar estabilizantes.

35

La composición puede incluir un sistema regulador, si se desea. Los sistemas reguladores se eligen para mantener o regular el pH de las composiciones dentro de un rango deseado. El término "sistema regulador" o

“regulador” como se usa aquí se refiere a un agente o agentes solutos que, cuando en una solución de agua, estabilizan dicha solución contra un cambio importante en el pH (o concentración de iones hidrógeno o actividad) cuando los ácidos o bases se agregan a esta. Son bien conocidos el agente o agentes solutos que son por lo tanto responsable de una resistencia o cambio en el pH de un valor de pH regulada en el rango indicado anteriormente. Aunque hay un sinnúmero de reguladores adecuados, el monohidrato de fosfato de potasio es un regulador preferido

El valor de pH final de la composición farmacéutica puede variar dentro del rango fisiológico compatible. Necesariamente, el valor de pH final no es irritante para la piel humana y, preferiblemente de tal manera que el transporte transdérmico del compuesto activo, es decir, se facilita una molécula de CoQ10. Sin violar esta restricción, el pH se puede seleccionar para mejorar la estabilidad una molécula de CoQ10 y para ajustar la consistencia cuando sea necesario. En una modalidad, el valor de pH preferido es aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,4, más preferiblemente de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,5, más preferiblemente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0.

Para los vehículos de suministro tópicos preferidos el componente restante de la composición es agua, que se purifica necesariamente, por ejemplo agua, desionizada. Tales composiciones de vehículo de suministro contienen agua en el rango de más de aproximadamente 50 a aproximadamente 95 por ciento, con base en el peso total de la composición. La cantidad específica de agua presente no es crítica, sin embargo, se ajustable para obtener la viscosidad deseada (usualmente aproximadamente 50 cps a aproximadamente 10.000 cps) y/o concentración de los otros componentes. El vehículo de suministro tópico tiene preferiblemente una viscosidad de por lo menos aproximadamente 30 centipoises.

Otros potenciadores de penetración en la piel conocidos transdérmicos también se puede utilizar para facilitar la entrega de una molécula de CoQ10. Son ilustrativos sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y similares; amidas cíclicas tales como 1-dodecilazacicloheptano-2-ona (Azone.TM, una marca registrada de Nelson Research, Inc.) y similares; amidas tales como N, N-dimetil acetamida (DMA) N, N-dietil- toluamida, N, N-dimetil formamida, N, N-dimetil octamida, N, decamida N-dimetilo, y similares; derivados de pirrolidona tales como N-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, ácido 2 -pirrolidona-5-carboxílico, N-(2-

hidroxietil) -2-pirrolidona o ésteres de ácido graso de los mismos, 1-lauril-4-metoxycarbonil-2-pirrolidona, N tallowalquilpirrolidonas, y similares; polioles tales como propilenglicol, etilenglicol, polietilenglicol, dipropilenglicol, glicerol, hexanotriol, y los similares; ácidos grasos lineales y ramificados tales como oleico, linoleico, láurico, valérico, heptanoico, caproico, mirístico, isovalérico, neopentanoico, trimetil hexanoico, isoesteárico, y similares, alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, octanol, oleilo, estearilo, linoleilo, y similares; tensoactivos aniónicos tales como laurato de sodio, lauril sulfato sódico, y similares; tensoactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio, cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, y análogos; tensoactivos no iónicos tales como los éteres de polioxietileno propoxilados, por ejemplo, Poloxámero 231, Poloxámero 182, Poloxámero 184, y similares, ácidos grasos etoxilados, por ejemplo, Tween 20, Myjr 45, y similares, el sorbitán derivados, por ejemplo, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 60, y similares, los alcoholes etoxilados, por ejemplo, polioxietileno (4) lauril éter (Brij 30), polioxietilen (2) éter oleílico (Brij 93), y similares, lecitina y derivados de lecitina, y similares; los terpenos, tales como D-limoneno, alfa.-pineno, Beta.-careno, alfa.-terpineol, carvol, carvona, mentona, limoneno, óxido de alfa - óxido pineno, aceite de eucalipto, y similares. También son adecuados como potenciadores de la penetración de la piel los ácidos orgánicos y ésteres tales como ácido salicílico, salicilato de metilo, ácido cítrico, ácido succínico, y similares.

En una modalidad, la presente invención proporciona composiciones de la molécula de CoQ10 y métodos para prepara la misma. Preferiblemente, las composiciones comprenden por lo menos aproximadamente 1% a aproximadamente 25% de una molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, p/p. CoQ10 se puede obtener de Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japón) como UBIDECARENONA (USP). También se pueden obtener de Kaneka Q10 como Kaneka Q10 (USP UBIDECARENONA) en forma de polvo (Pasadena, Texas, USA). El CoQ10 utilizado en los métodos ejemplificados aquí tienen las siguientes características: disolventes residuales que cumplen con los requerimientos USP 467; el contenido de agua es menor de 0.0%, menor de 0.05% o menor de 0.2%; el residuo en ignición es 0.0%, menor de 0.05%, o menor de 0.2%; el contenido de metal pesado es menor de 0.002%, o menor de 0.001%; la pureza de entre 98- 100% o 99.9%, o 99.5%. Aquí se proporcionan métodos para preparar las composiciones en los ejemplos en a sección de adelante.

En ciertas modalidades de la invención, se proporcionan métodos para tratar o prevenir sarcoma en un humano al administrar tópicamente una molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención, en donde al humano se administra una dosis típica de una molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, en un vehículo tópico donde la molécula se aplica a la Coenzima Q10 al tejido objetivo en el rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 miligramos de la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, por centímetro cuadrado de piel. En una modalidad, se aplica a la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, al tejido objetivo en el rango de aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.15 mg de CoQ10 por centímetro cuadrado de piel. En varias modalidades, la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, se aplica al tejido objetivo en el rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1.0, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.4, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.30, aproximadamente 0.10 a aproximadamente 0.25, o aproximadamente 0.10 a 0.20 mg de molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, por centímetro cuadrado de piel. En otras modalidades, la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, se aplica al tejido objetivo en una dosis de aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49 o 0.5 mg de CoQ10 por centímetro cuadrado de piel. En una modalidad, la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10, se aplica al tejido objetivo en una dosis de aproximadamente 0.12 mg de la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, por centímetro cuadrado de piel. Se debe entender que los rangos que tienen uno cualquiera de estos valores como los límites superior e inferior también están destinados a ser parte de esta invención, por ejemplo, aproximadamente 0.03 a aproximadamente 0.12, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.15, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.20, o aproximadamente 0.32 a aproximadamente 0.49 mg por centímetro cuadrado de piel.

En otra modalidad de la invención, la molécula de Coenzima Q10 se administra en la forma de una crema de molécula de CoQ10 en una dosificación de entre 0.5 y 10 miligramos de la crema de la molécula de CoQ10 por centímetro cuadrado de piel, en donde la crema de la molécula de CoQ10 comprende entre 1

y 5% de la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10. En una modalidad, la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema comprende aproximadamente 3% de la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10. En otras modalidades, la crema de la molécula de CoQ10 comprende aproximadamente 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% o 5% de la molécula de Coenzima Q10, por ejemplo, CoQ10. En varias modalidades, la crema de la molécula de CoQ10 se administra en una dosificación de aproximadamente 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 o 10 miligramos de molécula de CoQ10, por ejemplo, crema de CoQ10 por centímetro cuadrado de piel. Se debe entender que los rangos que tienen uno cualquiera de estos valores como los límites superior e inferior también están destinados a ser parte de esta invención, por ejemplo, entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 5.0, aproximadamente 1.5 y 2.5, o aproximadamente 2.5 y 5.5 mg de molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema por centímetro cuadrado de piel.

En otra modalidad, la molécula de Coenzima Q10 se administra en la forma de una crema de CoQ10 en una dosificación de entre 3 y 5 miligramos de la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema por centímetro cuadrado de piel, en donde la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema comprende entre 1 y 5% de Coenzima Q10. En una modalidad, la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema comprende aproximadamente 3% de Coenzima Q10. En otras modalidades, la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema comprende aproximadamente 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% o 5% de Coenzima Q10. En varias modalidades, la molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema se administra en una dosificación de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 o 5.0 miligramos de molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema por centímetro cuadrado de piel. Se debe entender que los rangos que tienen uno cualquiera de estos valores como los límites superior e inferior también están destinados a ser parte de esta invención, por ejemplo, entre aproximadamente 3.0 y aproximadamente 4.0, aproximadamente 3.3 y 5.3, o aproximadamente 4.5 y 4.9 mg de molécula de CoQ10, por ejemplo, CoQ10, crema por centímetro cuadrado de piel.

Ciertos aspectos de la invención proporcionan métodos para tratar o prevenir sarcoma en un humano al administrar tópicamente la Coenzima Q10 al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención, en donde la Coenzima Q10 se aplica tópicamente una o más veces por 24 horas durante seis semanas o más.

Ciertos aspectos de la invención proporcionan métodos para la preparación de una crema de coenzima Q10 3% que incluye las etapas para preparar una fase A, B, C, D y E y combinar todas las fases de tal manera que se forma una emulsión de aceite en agua de 3% de crema de CoQ10.

En algunas modalidades, los ingredientes de la Fase A incluyen benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ NF a 4.00% P/P, alcohol cetílico NF a 2.00% P/P, estearato de glicerilo/PEG- 100 a 4.5% P/P y alcohol estearílico NF a 1.50 % P/P, mientras que los ingredientes de la Fase B incluyen dietilenglicol monoetil éter NF a 5.00% P/P, USP glicerina a 2.00% P/P, propilenglicol USP a 1.50% P/P, fenoxietanol NF a 0.475% P/P, agua purificada USP a 16.725% p/p de dispersión y Carbómero 2% a 40.00% p/p y los ingredientes de la fase C incluyen ácido láctico USP a 0.50% p/p, solución de lactato de sodio USP al 2.00% p/p, trolamina NF a 1.30% p/p, y agua purificada USP a 2.50% p/p. Adicionalmente, en estas modalidades los ingredientes de la Fase D incluyen dióxido de titanio USP en 1.00% p/p mientras que los ingredientes de la Fase E incluyen CoQ10 concentrado 21% a 15% p/p.

En ciertas otras modalidades, los ingredientes de la Fase A incluyen triglicéridos cáprico/caprílico a 4.00% p/p, alcohol cetílico NF a 2.00% p/p, estearato de glicerilo/PEG- 100 a 4.5% y alcohol estearílico NF a 1.5% p/p mientras que los ingredientes de la Fase B incluyen dietilenglicol monoetil éter NF a 5.00% p/p, glicerina USP a 2.00% p/p, propilenglicol USP a 1.50% p/p, fenoxietanol NF a 0.475% P/P, agua purificada USP a 16.725% p/p y dispersión de Carbómero 2% a 40,00% p/p, y los ingredientes de la Fase C incluyen ácido láctico USP en 0.50% p/p, solución de lactato de sodio USP al 2.00% p/p, trolamina NF a 1.30% p/p, y agua purificada USP a 2.50% p/p. Adicionalmente, en estas modalidades, los ingredientes de la Fase D incluyen dióxido de titanio USP a 1.00% p/p, mientras que los ingredientes de la Fase E incluyen CoQ10 concentrado 21% a 15% p/p.

En ciertas modalidades de la invención, se proporcionan métodos para la preparación de una crema de coenzima Q10 3%, que incluyen las etapas de (1) agregar los ingredientes de la Fase A a un recipiente adecuado y calentar a 70-80 grados C en un baño de agua; (2) agregar los ingredientes de la fase B, excluyendo la dispersión Carbómero, en un recipiente adecuado y mezclar para formar una fase B mixta, (3) la colocar los ingredientes de la fase E en un recipiente adecuado y fundirlos en 50-60 grados C, utilizando un baño de agua

para formar una fase E derretida; (4) agregar la dispersión de Carbómero a un tanque de mezcla y calentar a 70-80 grados C mientras se mezcla, (5) agregar la fase B mezclada al tanque de mezcla mientras se mantiene la temperatura a 70 - 80 grados C, (6) agregar los ingredientes de la Fase C al Tanque de Mezcla
5 mientras se mantiene la temperatura a 70-80 grados C, (7) agregar los ingredientes de la Fase D al tanque de mezcla y luego continuar mezclando y homogeneizando los contenidos del tanque de mezcla, y luego (8) detener la homogeneización y enfriar los contenidos del tanque de mezcla a 50-60 grados C, y luego (9) interrumpir la mezcla y agregar la fase E fundida al tanque de mezcla
10 para formar una dispersión; (10) reanudar la mezcla hasta que la dispersión es lisa y uniforme, y luego (11) dejar enfriar el contenido del tanque de mezcla a 45-50 grados C.

En algunas otras modalidades de la invención, se proporciona una
15 composición farmacéutica que comprende crema de CoQ10 3%. La crema incluye una fase A que tiene benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ 4.00% p/p de la composición, alcohol cetílico a 2.00% p/p de la composición, alcohol estearílico a 1.5 p/p, estearato de glicerilo y PEG 100-a 4.5 p/p; una fase B que tiene glicerina a 2.00 P/P, propilenglicol a 1.5 P/P, etoxidiglicol a 5.0 P/P, fenoxietanol a 0.475 P/P, una
20 dispersión carbómero a 40.00 P/P, agua purificada a 16.725 p/p; una fase C que tiene trietanolamina a 1.300 P/P, ácido láctico a 0.500 P/P, la solución de lactato sódico a 2.000 P/P, a agua a 2.5 P/P; una fase D con dióxido de titanio a 1.000 P/P, y una fase E que tiene CoQ10 concentrado 21% a 15.000% p/p. En algunas modalidades la dispersión Carbómero incluye agua, fenoxietanol, propilenglicol y
25 940 Carbómero.

En algunas otras modalidades de la invención, se proporciona una
composición farmacéutica que comprende crema de CoQ10 3%. La crema incluye una fase A que tiene triglicéridos cáprico/caprílico a 4.00% p/p de la composición,
30 alcohol cetílico a 2.00% p/p de la composición, alcohol estearílico a 1.5% p/p, estearato de glicerilo y PEG 100-a 4.5 % p/p; una fase B que tiene glicerina a 2.00% p/p, propilenglicol a 1.5% p/p, etoxidiglicol a 5.0% p/p, fenoxietanol a 0.475% p/p, una dispersión carbómero a 40,00% p/p, agua purificada a 16,725% p/p; una fase C con trietanolamina a 1.300% p/p, ácido láctico a 0.500% p/p, la
35 solución de lactato sódico a p/p, 2.000% de agua a 2.5% p/p; una fase D con dióxido de titanio a 1.000% p/p; y una fase E que tiene CoQ10 concentrado 21% a 15,000% p/p. En algunas modalidades de la dispersión Carbómero incluye agua, fenoxietanol, propilenglicol y 940 Carbómero.

En algunas otras modalidades de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende crema de CoQ10 1.5%. La crema incluye una fase A que tiene benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ a 5.000% P/P, alcohol cetílico a 2.000% P/P, alcohol estearílico a 1.5% P/P, estearato de glicerilo y PEG-100 estearato a 4.500% P/P ; una fase B que tiene glicerina a 2.000% p/p, propileno a 1.750% p/p, etoxidiglicol a 5.000% p/p, fenoxietanol a 0.463% p/p, una dispersión carbómero a 50% p/p, y agua purificada a 11,377% p/p; una fase C con trietanolamina a 1.3% p/p, ácido láctico a 0.400% p/p, la solución de lactato sódico a 2.000% p/p, y agua a 4.210% p/p; una fase D que tiene dióxido de titanio a 1.000% p/p; y una fase E que tiene CoQ10 concentrado 21% a 1.500% p/p.

En algunas otras modalidades de la invención, se proporciona la composición farmacéutica que comprende una crema de CoQ10 1.5%. La crema incluye una fase A que tiene triglicéridos cáprico/caprílico en 5.000% P/P, alcohol cetílico a 2.000% P/P, alcohol estearílico a 1.5% p/p, estearato de glicerilo y PEG-100 estearato a 4.500% P/P; una fase B que tiene glicerina a 2.000% p/p, propileno a 1.750% p/p, etoxidiglicol a 5.000% p/p, fenoxietanol a 0.463% p/p, una dispersión carbómero a 50% p/p, y agua purificada a 11.377% p/p; una fase C con trietanolamina a 1.3% p/p, ácido láctico a 0.400% p/p, la solución de lactato sódico a 2.000% p/p, y agua a 4.210% p/p; una fase D con dióxido de titanio a 1.000% p/p; y una fase E que tiene CoQ10 concentrado 21% a 1.500% p/p. En algunas modalidades de la dispersión Carbómero incluye agua, fenoxietanol y propilenglicol.

1. Terapias de Combinación

En ciertas modalidades, una molécula de CoQ10 y/o composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden utilizar en la terapia de combinación con por lo menos un agente terapéutico. Una molécula de CoQ10 y/o su composición farmacéutica y el otro agente terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferiblemente, de forma sinérgica. En una modalidad, una molécula de CoQ10 y/o una de sus composiciones farmacéuticas se administra simultáneamente con la administración de otro agente terapéutico. En otra modalidad, una composición compuesta y/o farmacéutica del mismo se administra antes o después de la administración a otro agente terapéutico.

En una modalidad, los métodos terapéuticos de la invención comprenden agentes adicionales. Por ejemplo, en una modalidad, un agente adicional para su uso en los métodos terapéuticos de la invención es un agente quimioterapéutico.

- 5 Los agentes quimioterapéuticos en general pertenecen a clases diferentes, que incluyen, por ejemplo: 1. Inhibidores de topoisomerasa II (antibióticos citotóxicos), tales como las antraciclinas o antracenedionas, por ejemplo, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y nemorubicin, antraquinonas, por ejemplo, mitoxantrona y losoxantrona y podofilotoxinas, por ejemplo, etopósido y
- 10 tenipósido; 2., y los alcaloides de Vinka, vinblastina, por ejemplo, vincristina y vinorelbina, y los derivados de podofilotoxina, 3. Los agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina, sulfonatos de alquilo y otros compuestos con una acción de alquilación tal como nitrosoureas, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalan, 4. Los antimetabolitos
- 15 (inhibidores nucleósidos), por ejemplo, folatos, por ejemplo, ácido fólico, fiuropirimidinas, análogos de la purina o pirimidina tales como el 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, metotrexato y edatrexato, 5. Inhibidores de topoisomerasa I, como topotecán, irinotecán y 9 - nitrocamptotecina, y derivados de la camptotecina, y 6. Compuestos de platino/complejos, tales como el
- 20 oxaliplatino con cisplatino, carboplatino y; Ejemplos de agentes quimioterapéuticos para el uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, amifostina (Ethyol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, carrnustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicinalipo (doxil),
- 25 gemcitabina (gemzar), daunorubicina, daunorubicina lipo (Daunoxome), procarbazina, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5 - fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, la cladribina, camptotecina, la CPTI-1, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina,
- 30 ftorafur, 5 desoxiflurouridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloro adenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatina, picoplatina, tetraplatina, satraplatino, platino DACH, ormaplatina, CI-973 JM-216, y sus análogos, epirubicina, etopósido fosfato, 9 -aminocamptotecina, 10, 11-
- 35 metilenodioxycamptotecina, karenitecin, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, L-fenilalanina mostaza, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida carmustina, semustina, epotilonas AE, Tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir,

amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, rituximab, trastuzumab, 5-fluorouracilo, capecitabina, pentostatina, trimetrexato, cladribina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, idarubicina, mesna, irinotecán, mitoxantrona, topotecan, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, cisplatino, doxorubicina, paclitaxel (taxol) y bleomicina, y combinaciones de los mismos que son fácilmente evidentes para un experto en la técnica con base en el estándar apropiado de cuidado un tumor en particular o cáncer.

En otra modalidad, un agente adicional para su uso en las terapias de combinación de la invención es un agente biológico.

Los agentes biológicos (también llamado biologías) son el producto de un sistema biológico, por ejemplo, un organismo, células o sistema de recombinante. Ejemplos de tales agentes biológicos incluyen moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico anticodificante), interferones, interleucinas, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, agentes anti-angiogenia, y citocinas. Ejemplos de agentes biológicos se discuten con más detalle adelante y, en general pertenecen a diferentes clases, que incluyen, por ejemplo: 1. hormonas, análogos hormonales y complejos hormonales, por ejemplo, estrógenos y análogos de estrógeno, progesterona, análogos de progesterona y progestinas, andrógenos, adrenocorticosteroides, antiestrógenos, antiandrógenos, inhibidores de antitestosteronas, suprarrenales y hormonas esteroides, anti-luteinizante, y 2. Las enzimas, proteínas, péptidos, anticuerpos policlonales y/o monoclonales, tales como las interleucinas, interferones, el factor estimulante de colonias, etc.

En una modalidad, el agente biológico es un interferón. Los interferones (IFN) son un tipo de agente biológico que se produce naturalmente en el cuerpo. Los interferones son producidos en el laboratorio y se administran a pacientes con cáncer en la terapia biológica. Han demostrado que mejoran la forma en que el sistema inmunológico de paciente con cáncer actúa contra las células neoplásicas.

Los interferones pueden actuar directamente sobre las células neoplásicas para desacelerar su crecimiento, o pueden provocar que las células neoplásicas se conviertan en células con un comportamiento más normal. Algunos interferones

también pueden estimular las células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos, que son tipos de glóbulos blancos en la sangre que ayudan a combatir las células neoplásicas.

5 En una modalidad, el agente biológico es una interleucina. Interleucinas (IL) estimulan el crecimiento y la actividad de muchas células inmunes. Son proteínas (citocinas y quimiocinas) que ocurren naturalmente en el cuerpo, pero también se puede producir en el laboratorio.

10 Algunas interleucinas estimulan el crecimiento y la actividad de las células inmunes, como los linfocitos, que trabajan para destruir las células neoplásicas.

En otra modalidad, el agente biológico es un factor estimulante de colonias.

15 Los factores estimulantes de colonias (CSF) son proteínas que se administran a los pacientes para estimular los citoblastos en la médula ósea para producir más células sanguíneas. El organismo constantemente necesita nuevos glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, sobre todo cuando hay presencia de cáncer. Los CSF se administran, junto con la quimioterapia, para ayudar a
20 estimular el sistema inmunológico. Cuando los pacientes con cáncer reciben quimioterapia, se suprime la capacidad de la médula ósea para producir nuevas células sanguíneas, por lo que hacen pacientes más propensos a desarrollar infecciones. Las partes del sistema inmunológico no puede funcionar sin las células sanguíneas, así los factores estimulantes de colonias alientan a los
25 citoblastos de médula ósea para producir glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos.

Con una producción apropiada de células, otros tratamientos de cáncer pueden continuar permitiendo a los pacientes que reciban con seguridad dosis
30 más altas de quimioterapia.

En otra modalidad, el agente biológico es un anticuerpo. Los anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, que son agentes producidos en el laboratorio, que se unen a las células neoplásicas.

35

Cuando se introducen los agentes que destruyen el cáncer en el cuerpo, buscan los anticuerpos y matan las células neoplásicas. Agentes de anticuerpos monoclonales no destruyen las células sanas. Los anticuerpos monoclonales

consiguen su efecto terapéutico a través de diversos mecanismos. Ellos pueden tener efectos directos en la producción de la apoptosis o muerte celular programada. Se puede bloquear los receptores del factor de crecimiento, efectivamente detener la proliferación de las células tumorales. En las células que expresan anticuerpos monoclonales, pueden provocar la formación de anticuerpos anti idiotipo.

Ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar en el tratamiento de combinación de la invención se incluyen factor de crecimiento del receptor-1 similar a anti-insulina, anticuerpos anti-CD20, tal como pero no limitado a, cetuximab, tositumomab, rituximab, y ibritumomab. También se pueden utilizar anticuerpos Anti-HER2 en combinación con un influenciador de contorno para el tratamiento del cáncer. En una modalidad, el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab (Herceptin). Otros ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados en combinación con un influenciador de contorno para el tratamiento de cáncer incluyen anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, alemtuzumab), anticuerpos anti-CD-22 (por ejemplo, epratuzumab), y los anticuerpos anti-CD33 (por ejemplo, ozogamicina gemtuzumab). También se puede utilizar los anticuerpos anti-VEGF en combinación con un influenciador de contorno para el tratamiento del cáncer. En una modalidad, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. En otras modalidades, el agente biológico es una anticuerpo que es un anticuerpo anti-EGFR por ejemplo, cetuximab. Otro ejemplo es el anticuerpo anti-glicoproteína 17-1 Un edrecolomab.

En otra modalidad, el agente biológico es una citocina. La terapia con citocinas utiliza proteínas (citocinas) para ayudar al sistema inmune de un sujeto a reconocer y destruir las células que son neoplásicas. Las citocinas se producen naturalmente en el cuerpo por el sistema inmune, pero también se pueden producir en el laboratorio. Esta terapia se utiliza con melanoma avanzado y con terapia adyuvante (terapia dada después de o en adición al tratamiento del cáncer primario). La terapia con citocinas alcanza todas las partes del cuerpo para matar las células neoplásicas y evitar que crezcan los tumores.

En otra modalidad, el agente biológico es una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede utilizar Apo2L/TRAIL humana recombinante (Genentech) en una terapia combinada. La Apo2/TRAIL es el primer agonista del receptor pro-apoptósico doble diseñado para activar los receptores pro-apoptósicos DR4 y

H2
171

DR5, que están implicados en la regulación de la apoptosis (muerte celular programada).

En una modalidad, el agente biológico es una molécula de ácido nucleico anticodificante.

Como se usa aquí, un ácido nucleico "anticodificante" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "codificante" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena de codificación de una molécula de cADN bicatenario, complementaria a una secuencia de mRNA o complementaria a la cadena de codificación de un gen. De acuerdo con lo anterior, un ácido nucleico anticodificante puede hidrogenar un enlace a un ácido nucleico codificante.

En una modalidad, un agente biológico es una molécula de siARN, por ejemplo, de una molécula que mejora la angiogenia, por ejemplo, bFGF, VEGF y EGFR. En una modalidad, un agente biológico que inhibe la angiogenia media el ARNi. El ARN de interferencia (ARNi) es una técnica de inactivación de gen objetivo post-transcripcional que utiliza ARN bicatenario (dsARN) para degradar el ARN mensajero (mARN) que contiene la misma secuencia que el dsARN (Sharp, PA and Zamora, PD 287 de 2431 -2432 (2000); Zamora, PD, et al Cell 101, 25-33 (2000) Tuschl, T. et al Genes Dev 13, 3191-3197 (1999); TR. Cottrell and Doering TL 2003. Trends Microbiol 11:37-43; Bushman F.2003 Mol Therapy 7:9-10; McManus MT and Sharp PA 2002 de Nat Rev Genet 3.737-47). El proceso ocurre cuando una ribonucleasa endógena divide el dsARN en corto, por ejemplo, 21 o 22 ARN de longitud de nucleótidos, llamado ARN de interferencia pequeño o siARNs. Los pequeños segmentos de ARN entonces median la degradación del mARN objetivo. Los equipos para la síntesis de ARNi están disponibles comercialmente de, por ejemplo New England Biolabs or Ambion. En una modalidad, se pueden emplear uno o más químicos para su uso en el ARN anticodificante en las moléculas que median ARNi.

El uso de ácidos nucleicos anticodificantes para regular en forma descendente la expresión de una proteína particular en una célula es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Weintraub, H. et al, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol , Vol. 1 (1) 1986; Askari, FK y McDonnell, WM (1996) N. Eng. J. Med. 334:316 - 318, Bennett, MR y Schwartz, SM (1995) Circulation 92: 1981-1993; Mercola, D. y Cohen, JS

113
192

(1995) Cancer Gene Ther 2:47-59; Rossi, JJ (1995) Br Med Bull 51:217-225.; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335). Una molécula de ácido nucleico anticodificante comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena de codificación de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una
5 secuencia de mRNA) y de acuerdo con lo anterior es capaz de unir el hidrógeno a la cadena codificante de la otra molécula de ácido nucleico. Las secuencias anticodificantes complementarias con una secuencia de un mRNA pueden ser complementarias a una secuencia que se encuentra en la región codificante del mRNA, la región no traducida 5' o 3' del mRNA o una región de transición de la
10 región de codificación y una región no traducida (por ejemplo, la unión de la región 5' no traducida y la región de codificación). Adicionalmente, un ácido nucleico anticodificante puede ser complementario en secuencia a una región reguladora del gen que codifica el mRNA, por ejemplo una secuencia de iniciación de la transcripción o elemento regulador. Preferiblemente, un ácido nucleico
15 anticodificante está diseñado para que sea complementario a una región que precede o que abarca el codón de iniciación en la cadena de codificación o en la región 3' no traducida de un mRNA.

Dada las secuencias de cadena codificante de una molécula que mejora la
20 angiogenia, anticodificante ácidos nucleicos de la invención se pueden diseñar de acuerdo con las reglas de emparejamiento de base Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico anticodificante puede ser complementaria a la región codificadora completa del mRNA, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es anticodificante a solo una porción de la región codificadora o no
25 codificadora del mRNA. Por ejemplo, el oligonucleótido anticodificante puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción del mRNA. Un oligonucleótido anticodificante puede tener, por ejemplo, alrededor de nucleótidos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 de longitud.

30 Un ácido nucleico anticodificante de la invención se puede construir utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede sintetizar un ácido nucleico anticodificante (por ejemplo, un oligonucleótido anticodificante) químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados
35 diversamente diseñadas para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre el los ácidos nucleicos anticodificante y codificante, por ejemplo, se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos

modificados que pueden ser utilizados para generar el ácido nucleico anticodificante incluyen 5 - fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina xantina, 4-acetilcitosa, 5 - (carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil- 2-tiouridina, uracilo 5-carboximetilaminometil, 5-dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2.2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosa, 5-metilcitosa, N6-adenina, 7-metilguanina, 5 metilaminometiluracil-, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5 metoxiuracil-, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, uracilo-5 -oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosa, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3 - (3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, w (acp3), y 2.6-diaminopurina. Para inhibir la expresión en las células, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos anticodificante. Alternativamente, el ácido nucleico anticodificante se puede producir biológicamente utilizando un vector de expresión en el que ha subclonado un ácido nucleico en una orientación anticodificante (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación anticodificante a un ácido nucleico objetivo de interés, descritos adicionalmente en la subsección siguiente).

En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico anticodificante de la invención es una molécula de un ácido nucleico-anomérico. Una molécula de un ácido nucleico-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, contrariamente a la costumbre de algunas unidades, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier et al (1987) Nucleic Acids. Res. 15:6625 -6641). La molécula de ácido nucleico anticodificante puede también comprender un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et al (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131 -. 6148) o un análogo ARN-ADN quimérico (Inoue et al (1987) FEBS Lett . 215:327-330).

En otra modalidad, un ácido nucleico anticodificante de la invención es un compuesto que media ARNi. Agentes ARN interferentes incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de ácidos nucleicos, que incluyen moléculas de ARN que son homólogas al gen objetivo o la secuencia genómica, "ARN corto de interferencia" (siARN), "horquilla corta" o "pequeña horquilla de ARN" (shARN), y pequeñas moléculas que interfieren con o inhibir la expresión de un gen objetivo de ARN de interferencia (ARNi). La interferencia de ARN es una técnica de

inactivación de gen objetivo post-transcripcional que utiliza ARN bicatenario un post-transcripcional, dirigido silenciamiento génico técnica que utiliza ARN bicatenario (dsARN) para degradar el ARN mensajero (mARN) que contiene la misma secuencia que el dsARN (Sharp, PA y Zamora, DP 287, 2431-2432 (2000); Zamora, PD, et al celular 101, 25-33 (2000) Tuschl, T. et al Genes Dev 13, 3191-3197 (1999)). El proceso ocurre cuando una ribonucleasa endógena divide el dsARN en corto, por ejemplo, 21 o 22 ARN de longitud de nucleótidos, llamado ARN de interferencia pequeño o siARNs. Los pequeños segmentos de ARN entonces median la degradación del mARN objetivo. Los equipos para la síntesis de ARNi están disponibles comercialmente de, por ejemplo New England Biolabs y Ambion. Se puede emplear en una modalidad de uno o más de las químicas descritas anteriormente para uso en el ARN anticodificante.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas que, por ejemplo, inhiben la angiogenia, se pueden introducir en el sujeto en una forma adecuada para la expresión de la proteína codificada en las células del sujeto, también se puede utilizar en los métodos de la invención. Ejemplos de moléculas que inhiben la angiogenia incluyen, pero no se limitan a, TSP-I, TSP-2, IFN-g, IFN-a, endostatina angiostatina, tumastatina, canstatina, VEGI, PEDF, vasohibina, y el fragmento de 16 kDa de la prolactina 2-metoxiestradiol (véase, Kerbel (2004) J. Clin Invest 114:884, para su revisión).

Por ejemplo, una secuencia de ADNc de longitud total o parcial se clona en un vector de expresión recombinante y el vector se transfecta a una célula utilizando técnicas estándar de biología molecular. El ADNc se puede obtener, por ejemplo, mediante amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o al seleccionar una colección de ADNc apropiada. Las secuencias de nucleótidos del ADNc se puede utilizar para el diseño de los cebadores PCR que permiten la amplificación de un cADN por métodos estándar de PCR o para el diseño de una sonda de hibridación que se puede utilizar para escrutar la colección de cADN utilizando métodos de hibridación estándar. Después del aislamiento o la amplificación del cADN, el fragmento de ADN se introduce en un vector de expresión adecuado.

Ejemplos de agentes biológicos para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, gefitinib (Iressa), anastrozol, dietilstilbesterol, estradiol, premarin, raloxifene, progesterona, noretinodrel, estisterona, dimethisterona, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, caproato

26
175

hidroxiprogesterona, noretisterona, metiltestosterona, testosterona, dexamtasona, prednisona, Cortisol, solumedrol, tamoxifen, fulvestrant, toremifen, aminoglutetimida, testolactona, droloxifeno, anastrozol, bicalutamida, flutamida, nilutamida, goserelina, flutamida, leuprolida, triptorelina, aminoglutetimida, mitotano, goserelin, cetuximab, erlotinib, imatinib, Tositumomab, Alemtuzumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Bevacizumab, Denileukin diftitox, Daclizumab, interferon alfa, interferon beta, anti-4-IBB, anti-4-IBBL, anti-CD40, anti-CD 154, anti- OX40, anti-OX40L, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD70, anti-CD27, anti- HVEM, anti-LIGHT, anti-GITR, anti-GITRL, anti-CTLA-4, OX40L soluble, 4-IBBL soluble, CD 154 soluble, GITRL soluble, LIGHT soluble, CD70 soluble, CD80 soluble, CD86 soluble, CTLA4-Ig soluble, GVAX®, y combinaciones de los mismos que son fácilmente evidentes para un experto en la técnica con base en el estándar apropiado para el cuidado de un tumor en particular o cáncer. Las formas solubles de los agentes se pueden hacer como, por ejemplo proteínas de fusión, por la unión operativa con el agente, por ejemplo, región Ig-Fc.

Cabe señalar que se puede administrar más de un agente adicional, por ejemplo, 1. 2. 3, 4. 5n en combinación con una molécula de CoQ10. Por ejemplo, en una modalidad dos agentes quimioterapéuticos se pueden administrar en combinación con una molécula de CoQ10. En otra modalidad, se pueden administrar un agente quimioterapéutico, un agente biológico, y una molécula de CoQ10.

Se pueden utilizar varias formas de los agentes biológicos. Estos incluyen, sin limitación, formas tales como moléculas proforma, moléculas no cargadas, complejos moleculares, sales, éteres, ésteres, amidas y similares, que son biológicamente activos cuando se implanta, se inyecta o de lo contrario se inserta en el tumor.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes en modo alguno. El contenido de todas las referencias citadas, incluyendo referencias bibliográficas, las patentes emitidas y solicitudes de patente publicadas, citadas en esta solicitud están expresamente incorporadas por referencia.

Ejemplificación de la invención:

EJEMPLO 1: Identificación de CoQ10 como una MIM

Con el fin de evaluar CoQ10 como un MIM potencial, CoQ10 en forma oxidada se agrega exógenamente a un panel de estirpes celulares, que incluye
5 estirpes celulares de cáncer y estirpes celulares de control normal, y se evalúan los cambios inducidos al perfil de microentorno celular para cada estirpe celular en el panel. Los cambios en la morfología/fisiología celular, y en la composición celular, que incluyen mARN y niveles de proteína, se evalúan y se comparan para las células enfermas cuando se compara con células normales. Los resultados de
10 estos experimentos identificados CoQ10 y, en particular, la forma oxidada de CoQ10, como una MIM.

En un primer conjunto de experimentos, los cambios en la morfología/fisiología celular se evalúan al examinar la sensibilidad y la respuesta
15 apoptótica de las células a CoQ10. Un panel de estirpes celulares de piel que incluyen estirpes celulares de control (el cultivo principal de queratinocitos y melanocitos) y diversas estirpes celulares de cánceres piel (SK-MEL-28, melanoma piel no metastásico; SK-MEL-2, un melanoma de piel metastásico; o SCC, un carcinoma epidermoide; PaCa2, una estirpe celular de cáncer
20 pancreático; o HEP-G2, una estirpe celular de cáncer de hígado) se tratan con diversos niveles de la coenzima Q10. Los resultados de estos experimentos demuestran que las estirpes celulares de cáncer exhiben una respuesta dependiente de la dosis alterada cuando se compara con las estirpes celulares de control, con una inducción de apoptosis y muerte celular solo en células
25 neoplásicas.

Luego se emplean ensayos para evaluar cambios en la composición de la célula luego de tratamiento con CoQ10. Los cambios en la expresión de gen en el nivel de mARN se analizan utilizando metodología PCT en Tiempo Real. En
30 experimentos complementarios, los cambios en expresión de gen en el nivel de proteína se analizan al utilizar la metodología de la micromatriz del anticuerpo, electroforesis de gen bidimensional seguido por identificación de proteína utilizando caracterización de espectrometría de masa, y mediante análisis Western blot. Los resultados de estos ensayos demuestran que los cambios significativos
35 en la expresión de gen, el mARN y los niveles de proteína, se inducen en las estirpes celulares examinadas debido a la adición de la forma oxidada de CoQ10. Se encuentra que los genes modulan mediante tratamiento CoQ10 en diversas

rutas celulares, que incluye apoptosis, biología de cáncer y crecimiento de cáncer, glucólisis y metabolismo, transporte molecular, y señalización celular.

Se llevan a cabo experimentos para confirmar la entrada en CoQ10 en células y para determinar el nivel y forma de CoQ10 presente en las células. En particular, el nivel de la Coenzima Q10, así como también la forma de CoQ10 (es decir, oxidada o reducida), presente en la mitocondria se determina al analizar preparaciones ricas mitocondriales de células tratadas con CoQ10. El nivel de la Coenzima Q10 presente en la mitocondria se confirma para aumentar una forma dependiente de dosis y tiempo con la adición del Q10 exógeno. En un resultado sorprendente e inesperado, se determina que el CoQ10 esté presente en la mitocondria principalmente en forma oxidada. Adicionalmente, los cambios en los niveles de proteínas de muestras enriquecidas con mitocondrias se analizan al utilizar electroforesis de gel 2-D y la identificación de la proteína mediante caracterización de espectrometría de masa. Los resultados de estos experimentos demuestran que los niveles de la forma oxidada de CoQ10 en la mitocondria durante el curso del tiempo examinado se correlacionan con una amplia variedad de cambios celulares, como se evidencia mediante la modulación de mRNA y los niveles de proteína para proteínas específicas relacionado con las rutas metabólicas y apoptóticas.

Los resultados descritos por los Solicitantes identificados aquí la molécula endógena CoQ10 y, en particular, la forma oxidada de CoQ10, como una MIM. Por ejemplo, los resultados identificados CoQ10 como una MIM, debido a que se observa que el CoQ10 induce cambios en la expresión de gen el mRNA y el nivel de proteína. Los resultados identificados CoQ10 como tienen carácter multidimensional, debido a que el CoQ10 induce cambios diferenciales en la morfología/fisiología celular y la composición celular (por ejemplo, cambios diferenciales en la expresión de gen al mRNA y el nivel de proteína), en un estado de enfermedad (por ejemplo, cáncer) cuando se compara con un estado normal (por ejemplo, no cancerígeno). Más aún, los resultados identificados CoQ10 como tienen carácter multidimensional en que el CoQ10 es capaz de ingresar a una célula, y exhibe así los efectos terapéuticos y de portador.

EJEMPLO 2: Métodos para identificar los Procesos Relevantes y Biomarcadores para Sarcomas

129
148

A partir de los ensayos basados en células en los que las estirpes celulares, por ejemplo, las estirpes celulares de sarcoma, se tratan con una molécula de interés, las diferencias en las células tratadas vs las no tratadas se evalúa mediante matriz de mARN, matrices de anticuerpo de proteína, y electroforesis de gel 2D. Las proteínas identificadas del análisis de la muestra comparativa se modulan mediante MIM o cambiador Epi, por ejemplo, CoQ10, se evalúan desde una perspectiva Systems Biology con análisis de ruta (software Ingenuity IPA) y una revisión de la literatura conocida.

Las proteínas identificadas como objetivos terapéuticos potenciales o biomarcadores se someten a ensayos confirmatorios tales como análisis Western blot, siARN atenuado, o producción de proteína recombinante y métodos de caracterización.

EJEMPLO 3: Sensibilidades relativas de células oncogénicas y células normales para la coenzima Q10

Se examinan y se comparan los efectos de tratamiento de la coenzima Q10 en una variedad de estirpes celulares normales y oncogénicas. La sensibilidad de las células a la coenzima Q10 se evalúa al monitorear la inducción de apoptosis. Se lleva a cabo el tratamiento de células CoQ10 como se describe en detalle adelante en los Materiales y Métodos. Se evalúa la inducción de apoptosis en las células tratadas al monitorear los indicadores de apoptosis temprana (por ejemplo, expresión Bcl-2, activación de caspasa y al utilizar ensayos V de anexina) como se describe adelante.

Para estos estudios, se determina la dosificación mínima CoQ10, por ejemplo, concentración de CoQ10 y tiempo de tratamiento, requerido para inducir apoptosis en el panel de estirpes celulares.

En un resultado inesperado y sorprendente, los datos demuestran que la eficacia del tratamiento de Coenzima Q10 es mayor en los tipos de células que exhiben oncogenicidad aumentada y/o mayor potencial metastásico, es decir, los tipos de células que se derivan de cánceres o tumores más agresivos. Los resultados de estos estudios se resumen adelante en la Tabla 1. Los datos demuestran que el CoQ10 es más efectivo en tiempo y forma dependiente de concentración en células en un estado de cáncer más agresivo. Más aún, se observa un efecto divergente sorprendente en células normales cuando se

180
179

compara con células oncogénicas. Específicamente, se encuentra inesperadamente que la coenzima Q10 exhibe una función ligeramente de soporte en un ambiente de tejido normal, en donde se observa proliferación y migración aumentada en células normales, que incluye queratinocitos y fibroblastos dérmicos.

El efecto de la coenzima Q10 en los mecanismos de proteína y reguladores de gen en cáncer es diferente en una célula normal. La maquinaria celular clave y los componentes, tales como arquitectura citoesquelético, fluidez de membrana, mecanismos de transporte, inmunomodulación, angiogenia, control del ciclo celular, estabilidad genómica, control oxidativo, flujo glicolítico, control metabólico e integridad de las proteínas de matriz extracelular, se desregulan y así se altera la huella genética y molecular de la célula. El ambiente de la enfermedad favorece el gobierno de los procesos celulares de control. Los datos proporcionados aquí sugieren que el CoQ10 ejerce un mayor nivel de eficacia (por ejemplo, en células neoplásicas vs. células normales, y en células de un estado de cáncer más agresivo cuando se compara con células de un estado de cáncer menos agresivo o no agresivo) al normalizar algunos de los procesos clave mencionados anteriormente en una forma que permite restaurar el potencial apoptótico.

Tabla 1: Concentración mínima de CoQ10 y tiempo de tratamiento requerido para la inducción de apoptosis temprana en varios tipos celulares.

Origen de Tejido (Tipo de Célula)	Indicación de apoptosis temprana (Bcl-2, anexina V, o activación caspasa)	Concentración (µM)	Tiempo (hr)	Nivel de agresividad= 1= tejido normal 2= maligno 3=metastásico
PIEL:				
Queratinocitos (Heka, Hekn)	Ninguno	N/ A	N/ A	1
Fibroblastos (nFib)	Ninguno	N/ A	N/ A	1
Melanocitos (Hema, LP)	Ninguno	N/ A	N/ A	1
Melanoma (Skmel28)	Fuerte	20	24	2
Melanoma (Skmel2)	Muy Fuerte	25	24	3
SCC, Carcinoma de célula escamosa	Muy Fuerte	25	24	3
MAMA:				
MCF-7	Fuerte	50	48	2

181
180

SkBr-3	Muy Fuerte	50	24	3
BT-20	Fuerte	100	48	2
ZR-75	Ligero	200	72	2
MDA MB 468	Fuerte	100	48	2
Fibroblastos mamarios: 184A1 y 184B5) (Lawrence Berkeley)	Ninguno	N/ A		1
PRÓSTATA:				
PC3	Muy fuerte	25	24	3
HÍGADO:				
HepG2	Muy fuerte	50	24	3
Hep3B	Muy fuerte	50	24	3
ÓSEO:				
Osteosarcoma (143b)	Muy fuerte	50	48	2
Sarcoma de Ewing (NCI)	Extremadamente fuerte	5	1	3
PÁNCREAS:				
PaCa2	Muy fuerte	25	24	3
CORAZÓN:				
Músculo liso aórtico (HASMC)	Ninguno	N/ A	N/ A	1

Materiales y Métodos

Preparación y Tratamiento Celular

Células preparadas en platos o matraces

5

10

15

Las células se cultivan en matraces T-75 con medio relevante complementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (FBS), 1 % de PSA (penicilina, estreptomicina, amfotericina B) (Invitrogen y Cellgro) en un incubador a 37° C con 5 % de niveles de CO₂ hasta que se logra 70-80 % de confluencia. A las células cosechadas para tratamiento, los matraces se ceban con 1 mL de Tripsina, se aspiran, se tripnizan con 3 mL adicional, y se incuban a 37° C durante 3-5 minutos. Las células luego se neutralizan con un volumen igual de medio y la solución posterior se centrifuga a 10,000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden con 8.5 ml de medio. Una mezcla de 500 ul de la resuspensión y 9.5 ml de isopropanol se lee dos veces mediante un contador coulter y se determina el número apropiado de las células que se van a sembrar a cada plato. El control y concentración que varían de 0-200 µM grupos se examinan en triplicado. A partir de una solución madre CoQ-10 de 500 µM, se realizan diluciones seriales para lograr la concentración experimental deseada en platos

apropiados. Los platos se incuban en un incubador a 37° C con 5 % de niveles de CO₂ durante 0 - 72 horas dependiendo del tipo celular y el protocolo experimental.

Aislamiento y Cuantificación de la Proteína

5

Células preparadas en platos

Luego que se completa el periodo de incubación de tratamiento de la célula, se realiza aislamiento de proteína. Los platos de todos los grupos de tratamiento se lavan dos veces con 2 ml, y una vez con 1 ml de Solución salina reguladora con Fosfato 1x enfriado con fosfato (PBS). El PBS se aspira de los platos después de solo 2 lavados iniciales. Las células se raspan gentilmente y se recolectan en tubos de microcentrifuga utilizando el volumen final del tercer lavado y se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de centrifugación, el sobrenadante se aspira y el glóbulo se lisa con 50 uL de regulador de lisis (1uL de inhibidor de proteasa y fosfotasa para cada 100 uL de regulador de lisis). Las muestras luego se congelan durante la noche a -20° C.

Células preparadas en matraces

20

Después que se completa el periodo de incubación del tratamiento celular, se realiza aislamiento de la proteína. Los matraces de todos los grupos de tratamiento se lavan dos veces con 5 mL, y una vez con 3 mL de PBS 1x en hielo frío. El PBS se aspira de los matraces después de solo los primeros 2 lavados. Las células se raspan gentilmente y se recolectan en tubos de centrifuga de 15 mL utilizando el volumen final del tercer lavado y se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de centrifugación, el sobrenadante se aspira y el glóbulo se lisa con una cantidad apropiada de regulador de lisis (1 uL de inhibidor proteasa y fosfotasa para cada 100 uL de regulador de lisis). El volumen de regulador de lisis es dependiente del tamaño del glóbulo. Las muestras se transfieren en tubos de microcentrifuga y se congelan durante la noche a -20° C.

Cuantificación de la Proteína

35

Las muestras se descongelan a -4° C y se someten a sonicación para asegurar la homogenización el día después del aislamiento de la proteína. Se realiza la cuantificación de la proteína utilizando el equipo de ensayo de proteína micro BCA (Pierce). Para preparar las muestras para inmunotransferencia, se

prepara una solución de betamercaptoetanol 1: 19 (Sigma) al regulador de muestra (Bio-Rad). Las muestras se diluyen 1: 1 con la solución de regulador de muestra betamercaptoetanol, se hierve a 95° C durante 5 minutos, y se congela durante la noche a -20° C.

5

Inmuno-transferencia

Bcl-2, caspasa, 9, citocromo c

El volumen de la muestra para carga por pozo se determina utilizando la concentración de proteína media en bruto obtenida del ensayo de proteína BCA. Aproximadamente 30-60 µg de proteína se cargan para cada punto de tiempo de tratamiento. Las proteínas se hacen correr en triplicado en 12% de geles listos Tris-HCl (Bio-Rad) o geles de fundido manual en regulador de serie 1x a 85 y 100 voltios. Las proteínas luego se transfieren de papel nitrocelulosa durante una hora a 100 voltios, y se bloquean durante otra hora en una solución de leche al 5 %. Las membranas se ponen en anticuerpo primario (1 uL Ab: 1000 uL TBST) (Señalización Celular) durante la noche a -4° C. Al siguiente día, las membranas se lavan tres veces durante diez minutos cada una con Tris-Solución salina reguladora Tween-20 (TBST), y anticuerpo secundario (anti-conejo; 1uL Ab: 1000 uL TBST) se aplica durante una hora a -4° C. Las membranas se lavan de nuevo tres veces durante diez minutos con TBST y se completa la quimioluminiscencia utilizando el sustrato Pico o Femto (Pierce). Las membranas luego se desarrollan en intervalos de tiempo que producen los mejores resultados visuales. Después de desarrollo, las membranas se mantienen en TBST a -4° C hasta que se pueden medir los niveles de Actina.

Actina

Las membranas se colocan en anticuerpo de Actina primario (1uL Ab:5000 uL TBST) (señalización celular) durante 1 hora a -4° C, se lavan tres veces durante diez minutos cada uno con TBST, y anticuerpo secundario (anti-ratón; 1 uL Ab: 1000 uL TBST) se aplica durante hora a -4° C. Las membranas se lavan de nuevo tres veces durante diez minutos cada uno con TBST y se completa la quimioluminiscencia utilizando el sustrato Pico (Pierce). Las membranas luego se desarrollan en intervalos de tiempo que producen los mejores resultados visuales.

Ensayo anexina V

134
123

Las células se lavan dos veces en PBS10X y se resuspenden en Regulador de Unión (0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂). Se agregan muestras de 100 µl a un tubo de cultivo con 5 µl de tinte de anexina -PE o 7-ADD. Las células se mezclan y se incuban sin luz a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de lo cual, 400 µl de Regulador de Unión IX se agrega a cada muestra y se somete a análisis mediante citometría de flujo.

En los Ejemplos 4-7, adelante, la meta es obtener una visión en los mecanismos de CoQ10 acción particular a las células NCIES0808. La estirpe celular NCIES0808 se deriva directamente de un paciente con sarcoma Ewing y por lo tanto es la estirpe celular más relevante que se va a utilizar en el estudio. La idea base del proyecto es que este estudio será benéfico para el desarrollo de API y presenta en la comunidad una mejor comprensión de sus acciones.

El intento de los experimentos es para caracterizar los cambios dentro del ambiente celular en el ARN y el nivel de proteína se basa en los siguientes experimentos. (1) Matrices de PCR

- Angiogenia
- Diabetes
- Mitocondrial

- (2) Matrices de anticuerpo
- (3) Análisis de gel 2D
- (4) Análisis Western

Materiales y Métodos de los ejemplos 4-8

Solución madre de la coenzima Q10

Una Coenzima Q10 de 500 µM (5 % de isopropanol en medio de crecimiento celular) se prepara como sigue. Se hace una solución madre de 10 mL de la Coenzima Q10 500 µM fresca cada vez.

Peso Molecular: 863.34
 $(0.0005 \text{ mol/L})(0.010 \text{ L})(863.34 \text{ g/mol}) = 0.004317 \text{ g}$

Para hacer 10 mL de una solución madre 500 μ M, 4.32 mg de la coenzima Q10 se pesa en un tubo falcon de 15 mL, y se agrega 500 μ l de isopropanol. La solución se calienta en un baño de agua 50-60° C mientras se agita para disolver completamente. A esta solución, se agrega 9.5 mL de medio (el mismo medio en el que las células crecen).

Células NCIES0808.

Las células NCIES0808 se cultivan en DMEM/F12 que contiene glutamax y 17mM glucosa junto con 5 % de FBS, Penstrep y Amfotericina. Las células se pasan para obtener suficiente volumen para los experimentos.

Tratamiento y Aislamiento Total de la Proteína de la Coenzima Q10

Se acondiciona el medio complementado con concentraciones Q10 a 50 y 100 micromolares. Las células se tratan con control, 50 μ M Q10, y 100 μ M Q10 en triplicado. La proteína se aísla del matraz tratado y control después de 3, 6 o 24 horas. Para el aislamiento de las proteínas, las células se lavan tres veces con 5 mL de PBS enfriado en hielo a un pH de 7.4. Las células luego se pelan en 3 mL de PBS, se sedimentan mediante centrifuga, y se re-suspenden en un regulador de lisis a pH 7.4 (80 mM TRIS-HCl, 1% de SDS, con inhibidores de proteasa y fosfatasa). Se cuantifican las concentraciones proteína utilizando el método BCA.

Aislamiento de ARN:

Las células se lisan durante aislamiento ARN en diferentes tiempos de tratamiento utilizando el Mini equipo RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantifica ARN al medir la Densidad Óptica a 260 nm.

Síntesis de Primera Cadena:

Se sintetiza el cADN de primera cadena de 1 μ g de ARN total utilizando el equipo de Síntesis de Primera Cadena RT2 (SABiosciences., Frederick MD) como por las recomendaciones del fabricante.

PCR en tiempo real:

Los productos de la síntesis de primera cadena se diluyen con agua, se mezclan con el mezclador maestro verde SYBR (SABiosciences., Frederick MD) y se cargan en matrices de PCR. El PCR en tiempo real se hace correr en las Matrices PCR (Matrices de Apoptosis, Matrices de Diabetes, Estrés Oxidativo y Matrices de defensa de Antioxidante y Matrices de Proteína de Choque Térmico.) (SABiosciences, Frederick MD) en un Biorad CFX96.

Matrices de PCR:

Se colocan en placas células NCIES0808 en matraces T25 en una densidad de 2×10^6 células por matraz en medio o medio que contiene 50uM/100 uM de Q10. Todos los grupos de tratamiento corren en triplicado. Las células se cosechan a 0, 3, 6, 24 o 48 horas. Se toman fotografías para examinar la morfología celular antes de cosecha. Para cosechar las células, se retira el medio pero se guarda por ser capaz recolectar las células apoptósicas que flotan. Las células se triptinizan con 1 ml de tripsina-EDTA y la acción de la enzima se detiene mediante adición de 4ml de medio completo. Las células que se triptinizan se agregan al tubo apropiado que contiene el medio con células muertas. Se centrifugan las células a 1200 rpm durante 5 minutos y se aspira el medio dejando atrás el glóbulo celular para extracción de ARN. El aislamiento de ARN de los glóbulos celulares se lleva a cabo con el equipo RNeasy (Qiagen, Valencia CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se eluyen de columnas de giro en agua; se mide la absorbancia a 260nm, 230nm y 280nm. Se evalúa la pureza del ARN mediante las relaciones 260/230 y 280/230. La concentración de ARN en todas las muestras se calcula de los valores de absorbancia a 230 nm. Se sintetiza la cADN de primera cadena de 0.5ug de todas las muestras ARN utilizando las instrucciones proporcionadas con el equipo de Primera Cadena (SABiosciences, Frederick, MD). La primera cadena sintetizada de una muestra se dispensa igualmente en una placa de matriz PCR que contiene cebadores dentro de una ruta (Angiogenia, Diabetes y Mitocondria) (SABiosciences Corporación, Frederick, MD). Las matrices se amplifican con PCR en tiempo real utilizando los métodos de detección verdes SYBR utilizando los protocolos aprobados por el fabricante. Se calculan los valores ct de cada una de las muestras se normalizan a tres genes de mantenimiento y regulación de pliegue de los grupos tratados Q10 se compara con controles emparejados en el tiempo de células que crecen en medio regular media.

Preparación de la muestra para los proteómicos:

Se colocan en placas células NCIES0808 en matraces T25 en condiciones experimentales similares a aquellas descritas en la sección de matriz de PCR. Al final del periodo del tratamiento, las células se tripsinizan como se describe en la

5 sección de matriz de PCR y se lavan dos veces en TBS enfriado en hielo y congelados en nitrógeno líquido. El procesamiento adicional para Western blots se lleva a cabo a UMasa.

Las células NCIES0808 se tratan con Q10 separadamente en volúmenes

10 grandes para aislamiento suficiente de la mitocondria para análisis proteómico. Las células se tratan con medio, 50 uM de Q10 o 100 uM de Q10 durante 0, 3, 6, 24 y 48 horas en matraces T175. Se cultivan dos matraces para cada afección y las células de las dos se agrupan durante cosecha. Después del periodo de tratamiento requerido, las células se tripsinizan y se lavan dos veces en TBS

15 enfriado en hielo. Las células peletizadas se congelan en nitrógeno líquido y se congelan a -80° C hasta que se aísla la mitocondria. Se aísla la mitocondria utilizando las instrucciones del fabricante disponible con el Equipo de Aislamiento MitoProfile Mitosciences para Células Cultivadas (Mitosciences Inc, Eugene, OR).

20 Preparación de Western Blots:

Se cultivan células y se tratan con CoQ10 a 50 uM y 100 uM, junto con los controles apropiados. Los lisados celulares totales (como se preparó anteriormente) se procesan y se evalúan mediante análisis Western blot. Las

25 proteínas de cada grupo tratamiento se resuelven en SDS-PAGE y se transfieren en membranas PVDF. Estas luego se hibridan con anticuerpos.

Inmunotransferencia:

Se evalúa 5 o 10 µg de proteína por muestra mediante

30 inmunotransferencia. Las proteínas se separan en 10-20% de geles Tris-HCl o 4-12% de geles Bis-Tris, se transfieren por medio de electrofóresis a membranas PVDF y se bloquean utilizando a 5% de bloqueador GE/Amersham ECF y solución TBST antes de incubación con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos

35 primarios se incuban durante la noche a 4 grados C en una solución de 5% de BSA y TBST. Los anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se compran de vendedores comerciales. Los anticuerpos se utilizan en la dilución recomendada por el fabricante, con el control

pActina en una dilución de 1:5000. Las transferencias se realizan utilizando el reactivo GE/Amersham ECF, y los resultados se cuantifican utilizando el escáner de láser Fuji FL-5100 y software de análisis de densitometría Bio-Rad Quantity One. Todas las transferencias también se sondean y se normalizan en su expresión respectiva pActina.

Electrofóresis Bi-dimensional:

Antes de enfoque isoléctrico (IEF), las muestras se solubilizan en 40 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea, y 1% de detergente dipolar C7, reducido con tributilfosfino, y alquilado con 10 mM acrilamida durante 90 min a temperatura ambiente. Después que la muestra se hace correr en un dispositivo 10-kDa de corte Amicon Ultra con por lo menos 3 volúmenes del regulador de resuspensión, que consiste de 7 M urea, 2 M tiourea, y 2% de CHAPS para reducir la conductividad de la muestra. Se someten cien microgramos de la proteína a IEF en tiras y gradiente de pH inmovilizadas 11-cm pH 3 a 10, pH 4 a 7 o pH 6 a 11 (GE, Amersham, USA) a 100,000 voltios hora. Después de IEF, se equilibran las tiras de gradiente de pH inmovilizadas en 6 M urea, 2% de SDS, 50 mM regulador de Tris-acetato, pH 7.0, y 0.01% de azul bromofenol y se someten a electroforesis de gel SDS-poliacrilamida en gel Precast de 8 a 16% de Tris-HCl, 1 mm (Bio-Rad, USA). Los geles se hacen correr en duplicado. Estos se fijan, se tiñen en SYPRO Ruby, 80 mL/gel (Invitrogen, USA) y se dibujan en escáner láser Fuji FLA-5100.

Análisis de imagen:

Se realiza análisis de todas las imágenes de gel utilizando Progenia Discovery y Pro (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne, UK). Después de detección por manchado, emparejamiento, sustracción de fondo, normalización, y filtración, se exportan los datos para imágenes de gel SYPRO Ruby. Las comparaciones en forma de par entre los grupos se realizan utilizando la prueba t de Student en Descubrimiento de Progenia para identificar manchas cuya expresión se altera significativamente ($p > 0.05$). La anotación manual de cada mancha estadísticamente significativa se realiza para asegurar la detección.

Espectrometría de masa:

Los péptidos tripticos extraídos de tapones de gel respectivos se secan a un volumen 10 ul y se acidifican con 1-2 ul de 1% de TFA. Las muestras se cargan

189
188

en un uC18 Zip Tip (Millipore, Corp) después de pre-equilibración en 0.1% de TFA. Después de lavado con alícuotas de 2 x 10 µl de 0.1% de TFA, las muestras se depositan directamente en el objetivo de muestra MALDI utilizando 1 µl de solución de matriz 15 mg/ml de Ácido 2.5 Dihidroxibenzoico (MassPrep DHB, Waters Corp.) en 50:50 Acetonitrilo: 0.1% de TFA. Las muestras se dejan secar al
5 aire antes de inserción en el espectrómetro de masa. Se realiza análisis en un espectrómetro de masa de desorción/ionización de matriz asistido por láser Kratos Axima QIT (Shimadzu Instruments) (MALDI). Los péptidos se analizan en modo iónico positivo en rango de masa medio (700-3000 Da). El instrumento se
10 calibra externamente con Angiotensina II (1046.54), P14R (1533.86) y ACTH (18-39) 2465.20 Da. Los precursores se seleccionan con base en la intensidad de señal en un ancho de resolución de masa de 250 para fragmentación CID utilizando Argon como el gas de colisión. Se realizan búsquedas de bases de
datos doméstica con Mascot (Matrix Sciences, Ltd.) utilizando el programa de
15 Huella de Masa de Péptido para datos MS y el programa de Búsqueda de Iones MS/MS para los datos CID. Se confirman todas las identificaciones o se establecen con los datos CID (MS/MS).

Matriz de anticuerpo:

20

Se reciben las células NCIES0808 de SBH en matraces T165 (x 55). Las células son aproximadamente 90-95% confluentes y el medio tiene un color rosado típico. La morfología celular se examina cercanamente bajo un microscopio y se nota que las células parecen saludables sin signos visuales de contaminación
25 o inclusiones intracelulares.

Se hace una solución madre Q10 de 500 µM utilizando el mismo protocolo bosquejado para las matrices PCR. El medio se intercambia en cada matraz con medio Q10 50µM y 100µM que se reemplaza en los matraces apropiados. Las
30 células se incuban durante 3hr y 6hr en el medio formulado Q10 y se cosechan las células. Cada matraz se lava con 10ml de PBS enfriado con hielo y tripsiniza con 5ml de tripsina-EDTA. Las células se cosechan mediante pipeteo gentil y se detiene la acción de la enzima mediante la adición de 30ml de medio completo. Las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos y se aspira el tubo del
35 medio dejando atrás el glóbulo celular para extracción de la proteína.

Las proteínas se extraen de las células como en la página 2; sub-categoría 1A; de la Hoja de Información del Producto del fabricante, Sigma®, Panarama ®

Anticuerpo Micromatriz EPRESS Profiler725, cat#: XP725. El material de proteína de los lisados celulares completos se conjuga con tintes Cy3 y Cy5, GE Healthcare, producto #: 25-8009-86 Cy3 y 25-8009-87 Cy5 como por las instrucciones del fabricante bosquejadas en la hoja del producto sub-categoría IIA mencionada anteriormente. Los fragmentos de Matriz de Anticuerpo se preparan una vez de nuevo siguiendo las instrucciones del fabricante dadas en la sub-categoría III de la hoja de producto y se dejan secar durante 24hr. en un cuarto oscuro. Se analizan las matrices utilizando un escáner Fuji FLA-5100 UV A 532nm para el tinte Cy3 y 635nm para el tinte Cy5. Se recolectan los datos solo en el medio, las muestras de 50µM Q10 y 100 µM Q10 a 3hr. y 6hr. todas en triplicado.

Análisis IPA:

El resultado de los experimentos descritos adelante se combina utilizando Análisis de Ruta Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) como una herramienta para elucidar las rutas potenciales moduladas por Q10.

EJEMPLO 4: Sensibilidad de las Células NCI-ES-0808 al Tratamiento CoQ10

Se supervisa la morfología de las células NCI-ES-0808 siguiendo el tratamiento con CoQ10. Se toman fotografías de las células NCI-ES-0808 a través del microscopio 3, 6, 24 o 48 horas después de tratamiento con Q10 y justo antes de cosecha. Las células se unen parcialmente a las 3 horas después de tratamiento, pero durante seis horas, estas parecen estar completamente unidas. No hay diferencias en el número de morfología de células apoptóticas visualmente comprobables o el número de células parece evidente por el microscopio entre los grupos de tratamiento durante la escala de tiempo del experimento que es 3 hrs y 6 hrs post tratamiento (Figura 1).

EJEMPLO 5: Matrices de PCR en Tiempo Real

Se realizan los experimentos descritos en este ejemplo para probar las hipótesis general que el Q10 tendría un impacto en la expresión de múltiples genes en sarcoma de células Ewing. El mRNA de las células NCIES0808 tratadas con 50 µM o 100 µM Q10 durante varios momentos se evalúa mediante RT-PCR contra un panel de proteínas objetivo implicadas en diabetes humana, angiogenia humana o rutas mitocondriales humanas.

190

Los valores Ct obtenidos de un termocilador en tiempo real se cargan en la herramienta de análisis en el sitio web SABiosciences para el cálculo de veces de regulación comparados con células con el medio. Los genes que se modulan mediante CoQ10 en análisis de Matrices de Diabetes humana se resumen en la

5 Tabla 2. Los genes que se modulan mediante CoQ10 en análisis de las Matrices de Angiogenia Humana se resumen en la Tabla 3. Los genes que se incluyen en las tablas adelante son aquellas que muestran un valor p de cerca de 0.05. El análisis de las matrices Mitocondriales humana no revela ninguno de los genes modulados en las dosis CoQ10 y los puntos de tiempo examinados.

10

Tabla 2. Genes de Matrices de Diabetes Humana
Regulados en el nivel de mRNA principal de los cambios en células NCIES0808
tratado con 100 µM de CoQ10.

Gen	Patrón de regulación
ADRB	Regulación por ascenso a 24 horas con 100 uM de Q10.
CEACAM1	Regulación por ascenso a 48 horas con 100 uM de Q10.
DUSP4	Regulación por ascenso a 24 horas con 100 uM de Q10.
FOX C2	Regulación por ascenso a 24 horas con 100 uM de Q10
FOXP3	Regulación por ascenso a 6 horas con 50uM y 100 uM de Q10.
GCGR	Regulación por ascenso a 6 horas con 100 uM de Q10.
GPD1	Regulación por ascenso a 6 horas con 100 uM de Q10.
HMOX1	Regulación por ascenso a 24 y 48 horas con 100 uM de Q10
IL4R	Regulación por ascenso a 48 horas con 100 uM de Q10.
INPPL1	Regulación por ascenso a 6 horas con 100 uM de Q10.
IRS2	Regulación por ascenso a 6 horas con 100 uM de Q10.
VEGFA	Regulación por ascenso a 24 horas con 100 uM de Q10 y 48 horas con 50 uM de Q10.

15

Tabla 3. Genes de Matrices de Angiogenia Humana
Regulados en el nivel de mRNA principal de los cambios en células
NCIES0808 tratadas con 100 µM de CoQ10.

Gen	Patrón de regulación
ANGPTL3	Regulación por descenso a 3 horas con 100uM Q10.
CCL2	Regulación por descenso a 3 horas con 100uM Q10.
CDH5	Regulación por descenso a 3 y 24 horas con 100uM Q10.
CXCL1	Regulación por descenso a 3 horas con 100uM Q10

191

CXCL3	Regulación por descenso a 3 horas con 100uM Q10.
LAMAS	Regulación por ascenso a 6 horas con 100uM Q10.
PXLDC1	Regulación por ascenso a 48 horas con 100 uM de Q10.

EJEMPLO 6: Análisis de MicroMatriz de Anticuerpo

La evaluación de los cambios en la concentración de la proteína debido a la presencia de Q10 se evalúa a través de la utilización de métodos de micromatriz de anticuerpo. La micromatriz contiene los anticuerpos para 700 proteínas, que muestra un amplio rango de tipos de proteína y los marcadores de ruta potencial.

Para un análisis inicial de la eficiencia y reproducibilidad de la preparación del fragmento se realiza desde un punto de vista general de cada fragmento (n= 1, 2. 3) para todos los conjuntos de datos. Un análisis de patrón de la serie de datos 50µM Q10, 3hr muestra que aunque n= 1 y n=2 son muy similares n=3 tiene un patrón muy diferente. Por esta razón los datos n=3 se tuvieron en cuenta en la evaluación estadística de los datos de matriz.

Una vez se recolectan los conjuntos de datos para todas las matrices, los datos se cuentan contra tres parámetros principales. Primero los datos se normalizan utilizando el método de intensidades fluorescentes descrito en la sub-categoría V de las instrucciones del fabricante. Después del proceso de normalización cualesquier punto de datos con un valor cero para la relación normalizada Cy3/Cy5 se consideran estadísticamente irrelevantes y se retiran del conjunto de prueba. Una evaluación de los datos positivo y negativo Cy3/Cy5 (incluidos como controles en el fragmento) y una inspección visual de la densidad espectral para una mancha dada se determina y el punto de datos de matriz con una densidad espectral de menos de 10 se aproxima al nivel inferiore y parece estadísticamente irrelevante y se retira de las series de datos. Los datos resultantes se consideran como el conjunto de datos base para evaluación adicional. Cada conjunto de datos se clasifica de acuerdo con la relación de la densidad espectral normalizada y se evalúan las proteínas reguladas por ascenso y reguladas por descenso 45 superiores. Solo las proteínas que aparecen en todos los estudios replicados (n= 1, 2. 3) se nominan cuando son estadísticamente relevante y caen dentro del rango de 95% de confianza de estas evaluaciones estadísticas. Se debe notar que existe una varianza significativa dentro de cada conjunto de datos de los ensayos de tiempo de 3hr. Es probable que en este punto

192

de tiempo las células no converjan a un punto en donde las conclusiones se pueden extraer de los datos con un alto porcentaje de relevancia estadística. Sin embargo los datos obtenidos a partir de los puntos de tiempo de 6hr satisfacen todos nuestros análisis estadísticos y están presentes en los experimentos en replicado (n= 1, 2. 3) y los datos para este análisis se presentan adelante en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Proteínas Reguladas por Ascenso in Células NCIES0808 tratadas durante 6 Horas con 50 o 100 µM de CoQ10.

50 µm CoQ10 6 hr		100 µm CoQ10 6 hr
1	p300 CBP	FKHR FOXO1a
2	P53R2	MDM2
3	Receptor Fosfatidilserina	Ligando Fas
4	Péptido Citoqueratina 17	P53R2
5	Péptido Citoqueratina 13	Caspasa10
6	Neurofilamento 160 200	Crk2
7	Rab5	Cdc 6
8	Filensina	P21 WAF 1 Cip 1
9	P53R2	ASPP 1
10	MDM2	HDAC 4
11	MSH6	Ciclina B1
12	Factor 2 de Choque Térmico	CD 40
13	AFX	GAD 65
14	FLIPed	TAP
15	JAB 1	Par4 (respuesta de apoptosis de próstata 4)
16	Miosina	MRP 1
17	MEKK4	
18	cRaf pSer621	
19	PDK1	
20	Caspasa 12	
21	Fosfolipasa D1	
22	P34 cdc2	
23	P53 BP1	
24	BTK	
25	ASC2	

193

26	BUBR1	
27	ARTS	
28	PCAF	
29	Raf1	
30	MSK1	
31	SNAP25	
32	APRIL	
33	DAPK	
34	RAIDD	
35	HAT1	
36	PSF	
37	HDAC1	
38	Radl7	
39	Sobrevive	
40	SLIPR	
41	MAG 13	

Tabla 5. Proteínas Reguladas por Descenso en células NCIES0808 tratadas durante 6 Horas con 50 y 100 µM de CoQ10.

	50 µM CoQ10 6hr	100 µM CoQ10 6hr
1	PRMT3	α E-Catenina
2	HDAC2	Grb2
3	Sintasa de Óxido Nítrico bNOS	B ax
4	Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10	E2F2
5	MTA2	Kaiso
6	Descarboxilasa de Ácido Glutámico GAD65 67	Sintasa Quinasa Glicógeno 3
7	KSR	ATF2
8	HDAC4	HDRP MITR
9	BOB1 OBF1	Neurabina 1
10	A1 sintrofina	AP1
11	BAP1	Apaf 1
12	Importina 57	

126
144

13	MDC1	
14	Laminina 2 a2	
15	bcatenina	
16	FXR2	
17	Anexina V	
18	SMAC Diablo	
19	MBNL1	
20	Dimetil Histona h3	
21	Independencia del Factor de Crecimiento 1	11
22	U2AF65	
23	mTOR	

EJEMPLO 7: Análisis de Gel Bi-dimensional

Las células NCIES0808 tratadas durante 3, 6 y 24 horas se someten a electroforesis de gel 2-D y se analizan para identificar los cambios en el nivel de proteína con relación a las muestras del medio de control. Se realiza un análisis comparativo de las manchas a través de múltiples geles duplicados, se compara la “muestra del medio de control” contra todas las muestras tratadas en las dosis de 50uM y 100uM. El análisis incluye la identificación de los cambios en la mancha durante el curso de tiempo debido a un aumento, reducción, o modificación post-traducciona

Tabla 6. Proteínas Moduladas en células NCIES0808 tratadas durante 3, 6, y 24 Horas con 50 y 100 µM de CoQ10.

	NCI-0808: 3 horas Q-10		
	3 horas		
Identificación de la proteína:	Mancha	50uM Q10	100uM Q10
Subunidad 13 de la proteosoma 26S; Endofilina B1	240	-1.3	1.5
Cadena Ligera Reguladora de Miosina	612	1.4	1.4
hnRNP C1/C2	583	1.4	1.5
Ubiquilina 1; Fosfatasa 2A	940	1	1.3
hnRNP C1/C2	685	1.2	1.2

195

Actina similar 6A; Factor de Inicio Eucariótico 4A11		746	-1.3	1.2
Proteína del Canal de Cloruro Nuclear		938	-1.2	1.2
Subunidad de proteasoma 26S		284	-1.1	1.6
Superóxido de Dismutasa Cu/Zn		667	-1.1	1.4
Factor S asociado con Translina		154	1	1.9
		NCI-0808: 24 horas Q-10		
		24 horas		
Identificación de la proteína:		Mancha	50uM Q10	100uM Q10
Glicoproteína alfa 2-HS		16	1.4	5.9
Proteína ribosómica P2; histona 2A		130	-1.3	-4.2
Beta actina		180	1.3	3
hnRNP C1/C2		234	-1.2	-2.6
Proteína de choque térmico 70kD		244	1.1	1.7
Proteína asociada con microtúbulo		275	1.1	-1.8
Beta tubulina		311	1.7	2.6
Proteasoma alfa 3		314	1.1	-2.2
Helicasa II dependiente de ATP		363	1.2	2.1
Factor 1 delta de elongación de traducción eucariótica		369	1.1	-2
Lamina B1		372	1	-2.1
Supresor SMT 3 de dos 3 mif homólogo 2		387	1	-1.95
Proteína de choque térmico 27kD		388	1.1	-1.7
hnRNP C1/C2		396	-1.4	-2
Factor 1 beta 2 de elongación de traducción eucariótica		436	1	-1.9
Similar a HSPC-300		490	-1.2	1.5
Proteína de choque térmico 27kD		506	-1.2	-1.9
Factor 1 delta de elongación de traducción eucariótica		511	1	-1.6
Factor 1 delta de elongación de traducción eucariótica		524	1	-1.7
Isoforma 1 de respuesta putativa c-		532	1	1.4

197
196

myc				
Lamina B1		557	1	-1.6
Isoforma 1 asociada 2 raft de lípido ER; beta actina		575	1.1	1.6
Superóxido de dismutasa Cu/Zn		583	1.1	-1.3
Épsilon 3 de polimerasa de ADN dirigida a ADN; (canopia 2 homólogos)		622	-1.1	-1.6
Receptor 1 delta de la secuencia de señal		646	1	1.5
		+ = regulación por ascenso por Q10		
		- = regulación por descenso por Q10		

Nota: Un “1” indica que no existe cambio en la cantidad de la proteína.

Del análisis MASCOT se identifican más temprano manchas de nivel superior. En la segunda etapa de análisis se analizan las manchas de nivel y se basan en inspección visual y también se omiten los QC para identificación MS.

Adelante, la Tabla 7 es una lista de las proteínas ID para aquellas proteínas en la cantidad de la que se modulan en las células NCIES0808 tratadas con CoQ10 después de 3 horas que se identifican como manchas “nivel 2”.

Tabla 7. Proteínas Moduladas en células NCIES0808 tratadas durante 3 Horas con CoQ10.

- 545-Señal muy baja (no ID)
- 522-factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama
- 673-Bilverdin reductasa A, Transaldolasa 1
- 504-Queratina 1,10; Paratimosina
- 491 -GST omega 1
- 348-Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1
- 201-Activador Reg de Proteasoma (alfa)
- 270-No hay señales significativas (no ID)
- 233-isoforma A de la proteína 1 del complejo T
- 289-Beta Actina

198-
197

- 401 -Cadena A Tapasina ERP57; Chaperonina que contiene TCP1
- 429-Ubiquitina que activa la enzima E1
- 346-Ubiquitina que activa la enzima E1; Alanil-tARN sintetasa
- 254-Dinactina 1
- 5 323-Proteína de choque térmico 60kd
- 275-Beta Actina
- 356-Espermidina sintasa; beta actina
- 385-Proteína de choque térmico 70kd

10 También se analiza una preparación mitocondrial de la muestra NCIES0808 para proteínas y adelante, la Tabla 8, es la lista de la cantidad de proteínas de las que se modula luego de tratamiento con CoQ10.

● **Tabla 8. Proteínas Moduladas en células NCIES0808 tratadas con CoQ10.**

- 15 108-proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A
- 1000- Proteína de unión a ADN TAR
- 37-factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2
- 227-chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3
- 20 172-dineína citoplásmica IC-2

Ejemplo 8: Análisis Western blot

● 25 Las células NCIES0808 tratadas durante 24 horas con 50 o 100 µM Q10 se someten a análisis Western blot y se analizan para identificar los cambios en el nivel de proteína con relación a las muestras del medio de control.

30 La proteína obtenida de las células tratadas se evalúa mediante análisis Western blot contra un anticuerpo para la enzima que convierte Angiotensina (ACE) (Figura 4A), un anticuerpo para Caspasa 3 (Figura 4B), un anticuerpo para GARS (Figura 4C), un anticuerpo para la Matriz Metaloproteínase 6 (MMP-6) (Figura 4D) y una serie de anticuerpos para Neurolisina (NLN) (Figuras 4E-F). Los resultados de estos experimentos demuestran que todas las proteínas examinadas se regulan por descenso como un resultado del tratamiento celular
35 con Q10. En particular, existe una regulación por descenso marcada de Caspasa 3 A 24 horas de tratamiento con 100 µM Q10.

198

Tabla 9: Proteínas moduladas en células NCIES0808 analizadas por análisis Western

Enzima que convierte angiotensina (ACE)	regulado por descenso
Caspasa 3	regulado por descenso
GARS	regulado por descenso
Matriz	regulado por descenso
Metaloproteinasa 6	
Neurolisina	regulado por descenso

5 **Discusión de los Ejemplos 4-8**

El Sarcoma de Ewing es una incidencia de cáncer altamente agresivo el cual no parece estar asociado con la herencia Mendeliana, la exposición ambiental o al fármaco. La característica más consistente de ES es la presencia de un gen de fusión como un resultado de la translocación cromosómica entre el sitio EWSR1 y el gen de factor de transcripción ETS. Los genes de fusión EwS-ETS codifican los factores de trascipción tales como el EWS-FLI1, el funcionamiento aberrante de cual se asocia con patogenia ES. Los avances recientes en el uso de tecnologías de alto rendimiento (HTS) han empezado a proporcionar una comprensión de la consecuencia funcional de EWS-FLI1.

Los resultados proporcionados en los Ejemplos anteriores describen el análisis de datos proteómicos que demuestran la influencia de la coenzima Q10 en los marcadores genéticos clave que caracterizan la etiología del Sarcoma de Ewing. Una combinación de la matriz de anticuerpo, electroforesis de gel /espectroscopía de masa bi-dimensional y micromatriz de reacción de la cadena polimerasa en tiempo real identificada sobre 90 productos de expresión de gen de los que parece estar influenciado significativamente en las estirpes celulares del Sarcoma de Ewing (JDT, 0808) en respuesta al tratamiento CoQ10. De estos, el patrón de expresión de aproximadamente 60% de los productos de gen identificados se regula por ascenso y 40% se regula por descenso. Los grupos funcionales se identifican utilizando “la Base de datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado” [DAVID] que subdivide los genes en 42 grupos principales. El número máximo de genes de la lista se segregan dentro de

“Proceso de Regulación de Celular” y los grupos funcionales del “Proceso Metabólico” con otras proteínas esparcidas sobre los grupos funcionales que incluyen regulación de transcripción, muerte celular programada, desarrollo celular, citoesqueleto, núcleo, proteosoma y desarrollo de órgano. La evaluación

5 funcional de la proteína y su modulación de los eventos celulares sugiere que las células de Ewing expuestas a CoQ10 induce la expresión global de las proteínas de citoesqueleto, la desestabilización resultante de la arquitectura estructural inicia la culminación de un programa celular en respuesta apoptótica rápida y robusta.

10 **A. Coenzima Q10 modula la expresión de diversas proteínas citoesqueléticas: Interrupción de la arquitectura celular en el inicio de la respuesta de apoptosis.**

El tratamiento de la estirpe celular de Sarcoma de Ewing con CoQ10 resulta

15 en la expresión alterada de numerosos componentes citoesqueléticos que incluyen microfilamentos (beta actina, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, proteína ACTL6 relacionada con actina), filamentos intermedios (queratina 1, 10, 13, 17) y microtúbulos (beta tubulina, proteína asociada a microtúbulo, dineina), proteínas que interactúan (dinactina) y chaperonas (chaperonina que contiene

20 TCP1). Este fenómeno está soportado en parte por el aumento observado en las proteínas ribosómicas (RPLP2), los factores de inicio de traducción eucariótica (EIF3G, EIF4A2) y el factor de elongación de traducción eucariótica (EEF1B2, EEF1D). El aumento correspondiente en la expresión de la proteína de choque

25 térmico (HSP27, HSP60, HSP70), y la capacidad bien documentada de HSP27 para regular por ascenso la expresión de actina y estabilizar la estructura microtubular sugieren que el CoQ10 medie la alteración en la expresión de las proteínas estructurales que desestabiliza la arquitectura citoesquelética (Robitaille

30 *et al*, 2009; Mounier & Arrigo, 2002). Está bien establecida la implicación de los cambios asociados con el citoesqueleto en la ejecución de apoptosis por ejemplo redondeo celular, ampollamiento de la membrana y condensación de cromatina (Mills *et al*, 1999). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la interrupción o

modulación del citoesqueleto es una etapa requerida en el proceso de apoptosis (Pawalak & Helfman, 2001). La interrupción del citoesqueleto mediante

35 citochalasin D resulta en un incremento en la activación de Caspasa 3 y acelera la apoptosis inducida por daño en el ADN. Este efecto se recapitula por la observación que 100 μ M de CoQ10 provoca un aumento de 30% en la expresión de Caspasa 3 dentro de una hora después de exposición en la estirpe celular de Ewing JDT. Dado que los microtúbulos tales como dineina (cuya expresión se

aumenta en respuesta a CoQ10) facilitan el transporte de p53 al núcleo en respuesta al daño del ADN y las proteínas asociadas a tubulina y microtúbulo cumplen una función esencial en el proceso de mitosis, esto sugiere que el CoQ10 interrumpe/desestabiliza la arquitectura citoesquelética y el ciclo celular que resulta en la activación de la muerte celular programada.

B. CoQ10 desinhibe la represión mediada por EWS-ETS de apoptosis por medio de las rutas CBP/p300

Una de las proteínas reguladas por ascenso en respuesta a la exposición CoQ10 en la estirpe celular NCIES0808 es la proteína de unión CBP/p300, la proteína de unión CREB y su homólogo de proteína de unión E1A ambos de los cuales son coactivadores transcripcionales bien caracterizados (Chirivia JC *et al*, 1995; Eckner R *et al*, 1994). CBP y p300 tienen funciones celulares similares que regulan el crecimiento y desarrollo celular (Janknecht R, 2002; Goodman & Smolik. 2000). La CBP/p300 funciona como un co-activador para numerosos factores transcripcionales y parecen servir como puente/andamio dentro de la maquinaria transcripcional (Smolik & Goodman, 2000). Existe evidencia que la actividad transcripcional del producto génico EWSR1 en mantenimiento de la función celular normal está mediado en parte por medio de la interacción con el CBP/p300 (Araya *et al*, 2003; Rossow & Janknecht, 2001). Adicionalmente, utilizando eliminación de mutantes se demuestra que el Fli-1 solo y la fusión EWS-FLII se une a CBP e interfiere con la actividad transcripcional del receptor nuclear (Ramakrishnan *et al*, 2004). La evidencia de modulación indirecta de proteínas de fusión EWS-ETS mediante CBP/p300 se basa en su capacidad para interactuar con helicasa A ARN (RHA), un miembro de la familia DEXH de las helicasas de ARN y polimerasa II de ARN para modular la transcripción (Nakajima T, 1997). La expresión de RHA se encuentra en las estirpes celulares ES y tumor y una interacción física entre RHA y fusión EWS-FLII parece que mejora el potencial transcripcional y transformacional de la proteína EWS-FLII (Toretsky *et al*, 2006). De hecho, se ha propuesto objetiva la actividad de los cofactores transcripcionales tales como CBP por el EWS-ETS pueden ser responsables en parte de la transformación de la célula (Fujimura *et al*, 1996). Este concepto está soportado por la observación que las rutas apoptóticas suprimidas EWS-FLII mediante influencia de la ruta CBP/p300 (Ramakrishnan *et al*, 2004). En el mismo estudio también demuestra que aumentar los niveles celulares de CBP/p300 sensibilizan las células para apoptosis de ácido retinoico (Ramakrishnan *et al*, 2004). En el presente estudio, el tratamiento de la estirpe celular ES0808 con CoQ10 resulta en

un aumento en la expresión de CBP/p300 (comparado con valores iniciales). Se propone que el aumento mediado CoQ10 en CBP/p300 reactiva (es decir desinhibe) las rutas apópticas que se reprime usualmente por proteínas EWS-ETS en Sarcoma Ewing.

5

C. CoQ10 induce muerte celular en estirpes celulares de Sarcoma de Ewing se debe a la activación del factor de transcripción p53 regula la apoptosis.

Múltiples estirpes de evidencia soportan una función para apoptosis en CoQ10 induce muerte celular en las estirpes celulares del modelo de sarcoma de Ewing. Los más prominente de estas es el involucramiento de la activación p53 se demuestra mediante un aumento significativo en su expresión en las estirpes celulares de Ewing JDT una hora después tratamiento con CoQ10. Se establece bien que el factor de transcripción p53 se activa en respuesta el daño celular/tensión, rutas activantes de la expresión de gen que conducen a disminuir el ciclo celular o apoptosis (Levine, 1997; Giaccia y Kastan, 1998). Adicionalmente, el CBP/p300 interactúa con p53 y activa transcripcionalmente p53 dependiente MDM2, p21 y los promotores Bax (Avantaggiati *et al*, 1997; Gu *et al*, 1997; Lill *et al*, 1997) y residuos de lisina específicos de acetilato y aumento de propiedad de unión de ADN de p53 (Gu & Roeder, 1997). Así, el CoQ10 aumenta directamente y/o indirectamente la expresión de p53 en la estirpe celular del Sarcoma de Ewing.

Una disminución en Ku70 (también conocida en la técnica y aquí como helicasa II dependiente de ATP) se observa en estirpes celulares del sarcoma de Ewing ES0808 tratadas con CoQ10. Ku70 se asocia a la proteína Bax proapoptósica y tiene una actividad enzimática de ubiquitina (Rathaus *et al*, 2009). La evidencia reciente sugiere que el p53 acetilado tiene capacidad para prevenir y perturbar el complejo Ku70-Bax para mejorar la apoptosis (Yamaguchi *et al* 2009). Por lo tanto, se sugiere que la disminución inducida por CoQ10 en Ku70 en consorcio con la actividad de p53 incrementada podría aumentar la actividad pro-apoptósica de Bax.

El tratamiento con CoQ10 da lugar a la regulación por descenso de la expresión de ribonucleoproteína heterogénea nuclear C (hnRNP C1/C2) que se mantiene hasta 24 horas. Las proteínas hnRNP C1/C2 son parte del complejo que forma el inhibidor ligado a X de la apoptosis (XIAP) y el sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) (Holcík *et al* 2003). El XIAP es el inhibidor más potente

intrínseco de la apoptosis y se une la caspasa 3, caspasa 7 y la caspasa 9 e inhibe sus actividades (Deveraux et al, 1997). La sobre-expresión de hnRNP C1/C2 específicamente mejora la traducción de los IRES XIAP lo que sugiere un papel en la modulación de la expresión XIAP (Holcik et al, 2003). Se propone que la reducción de la expresión hnRNP C1/C2 disminuye la expresión de XIAP y aumenta la sensibilidad de las estirpes celulares del sarcoma de Ewing a la apoptosis inducida por CoQ10. Esta hipótesis se apoya por el aumento significativo de la expresión de la caspasa 3 se observada en la estirpe celular del Sarcoma de Ewing JDT una hora después del tratamiento con CoQ10. La observación de que hnRNP C1/C2 co-purifica con proteína EWS (Zinszner et al, 1994) sugiere una nueva ruta para la regulación de XIAP y el potencial anti-apoptóticos de fusiones EWS-FLI1.

Las estirpes celulares de Sarcoma de Ewing ES0808 tratadas con CoQ10 demuestran aumentos sostenidos en la expresión de varias subunidades que hacen la proteosoma que incluye subunidades de proteosoma PSMA3, PSMB3 y PSMB4 y enzimas de ubiquitina (ubiquilin). El proteosoma es un gran complejo de multi-proteínas múltiples que reconoce, une y degrada proteínas marcadas por una etiqueta poliubiquitina. Dado que el proceso de la apoptosis se acompaña de disminución progresiva del tamaño celular, los proteosomas son esenciales para la degradación de las proteínas citoplasmáticas y nucleares (Wojcik, 1999). De hecho, la activación del sistema proteosoma durante la apoptosis se ha reportado anteriormente (Drexler, 1998; Piedimonte, 1999).

Otras proteínas de la modulación que soportan una función para rutas de apoptosis y de otro tipo, tales como la desestabilización de la arquitectura estructural de la célula, en citotoxicidad inducida por CoQ10 (por ejemplo, la inhibición del crecimiento de células tumorales o activación de la apoptosis) de las células del sarcoma de Ewing incluyen:

(a) Aumento en la expresión Jab1: Jab1 (dominio de unión de activación Jun o CSN5) es parte de la regulación de la signalosome COP9 que regula múltiples rutas de señalización. Jab1 es una proteína de unión específica a BcLGs y mejora las rutas proapoptóticas dependientes del dominio BH3 (Liu X, et al. *Cell Signaling* 20 (1): 230-240, 2008).

(b) Aumento en expresión 53R2: La ribonucleósido difosfato reductasa es una enzima implicada en la síntesis y reparación de ADN nuclear y

204
203

mitocondrial. Se induce la expresión p53R2 por p53 luego del daño en el ADN. La sobreexpresión de p53R2 interfiere con la regulación de p53 dependen de la ruta de reparación del ADN e incrementa la sensibilidad de las células a los fármacos contra el cáncer (Yamaguchi T, *et al Cancer Res* 2001 nov 15, 61 (22): 8256-62; Nakamura Y: *Cancer Sci.* 95(1):7-11, 2004.; Pontarin G, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(46): 17801-6, 2008.).

(c) Aumento de la expresión de receptores fosfatidilserina: Estos receptores se expresan en la superficies celulares de antígeno que presentan células (APC) similares a macrófagos y células dendríticas. Estas pueden interactuar potencialmente con fosfatidilserina o fosfatidilserina secretada que emana de las células apoptóticas y promover la respuesta anti-inflamatoria al ayudar en el reclutamiento de macrófagos tumorales (Kim JS, *et al. Experimental Med molecular.* 37 (6): 575-87, 2005).

(d)

(e) Aumento en la expresión de péptidos de citoqueratina 13 y 17: Los péptidos de citoqueratina pertenecen a una familia de proteínas del citoesqueleto intra-citoplasmático, cuya expresión desregulada se ha implicado en los carcinomas de células basales (BCC) (Lo BK, *et al. Am J Pathol.* 176 (5): 2435-46, 2010.). La expresión de citoqueratinas es uno de los marcadores más consistentes para el diagnóstico de los adenocarcinomas de pulmón y colorrectal (Kummar S, *et al Br J Cancer* 86 (12): 1884-7, de 2002.). Aunque los péptidos citoqueratina (por ejemplo, 18) se conocen por ser un producto final de la proteólisis de la caspasa 3, no se ha reportado mucho acerca de los péptidos 17 y 13 como productos de la cascada de la apoptosis. Sin embargo se ha demostrado que el CK 17 colocaliza con receptor de quimioquinas que tienen una función en la quimiotaxis de leucocitos en la tumorigenia BCC. Es probable que estos productos son el efecto de la apoptosis aumentada o la causa de la tumorigenia alterada en células NCI0808 tratadas.

(f) Aumento de la expresión de neurofilamentos 160 y 200: Los neurofilamentos 160 y 200 son isoformas respectivas de proteínas de filamentos intermedios expresadas en las células neuronales. Se ha observado los sarcomas de Ewing son de origen neuronal, expresión

anormal de la isoforma 200 kD en una estirpe celular EWS (Lizard-Nacol S, *et al. Tumour Biol.* 13(1-2):36-43, 1992.).

5 **(g) Aumento en la expresión de Rab5:** Rab 5 es una pequeña GTPasa involucrada en la autofagia y el procesamiento de células apoptóticas en fagosomas (Kinchen JM, *et al Nature* 464 (7289): 778-82, 2010). Su expresión incrementada en las células NCI0808 tratadas con CoQ10 representa las fases terminales de eventos post-opoptósicos.

10 **(h) Aumento en la expresión de AFX:** También conocida como FOXO4, es un miembro de la familia del factor de transcripción de cabeza de tenedor. FOXO4 está regulada por NAD dependiente de deacetilasa SIRT1 y acetil transferasas, CBP/P300. FOXO4 activa las respuesta al estrés oxidativo (MnSOD), reparación de ADN (GADD45), detención ciclo celular (p27Kipl) y apoptosis de genes (ligando Bim y Fas) (Giannakou ME, *et al. Trends*
15 *Cell Biol.* 14(8):408-12, 2004). El aumento de expresión AFX es consistente con una mayor susceptibilidad de las células NCI0808 a muerte celular inducida por CoQ10. FOXO4a también se regula de forma ascendente después del tratamiento con 100 µM de CoQ10,

20

(i) Aumento en la expresión de MEKK4: También conocida como MAP3K4, se trata de una proteína quinasa activada por mitógenos quinasa 4, que regula las quinasas activadas por mitógenos en forma descendiente, p38 y cJun N-terminal quinasa (JNK). Se ha demostrado que la activación de MEKK4 en cardiomiocitos provoca niveles elevados de apoptosis (Mizote I, *et al. J Mol Cell Cardiol.* 48(2):302-9, 2010). El aumento en la expresión MEKK4 en células NCI0808 tratadas con 50 µM de CoQ10 podría ser representativo de la apoptosis en curso en respuesta al tratamiento.

25

30 **(j) Disminución de la expresión de HDAC2:** CBP/p300 interactúa con HDAC2 para aumentar la actividad del promotor de Bcl2, la actividad se atenúa en la presencia de inhibidores de HDAC (Duan H, *et al. Molecular and Cellular Biology* Por lo tanto, una disminución en HDAC2 expresión en respuesta a CoQ10 debe disminuir la actividad del promotor (y la función
35 antiapoptósica adjunto) de BCL2.

(k) Disminución de la expresión HDAC4: La interacción CBP/p300 con HDAC4 está involucrada en la regulación transcripcional de HIF-1α (Seo

HW, *et al FEBS Letters* 583:55-60, 2009; Buchwald H, *et al Cancer Letters*. 280: 160-167, 2009). Así, la disminución en la expresión de HDAC4 por CoQ10 debe reducir la activación transcripcional de HIF-1 α y cascadas de señalización en dirección 3' asociadas con la transformación celular y la oncogenia.

(l) Aumento en la expresión PDK1: La Fosfoinositida 3 cinasa dependiente de fosfato de 1 (PDK1) es el regulador maestro de AKT y cumple una función en la supervivencia celular a través de señalización AKT. Recientemente la activación constitutiva de los complejos de MEK / ERK y PI3K/AKT ha sido reportada en los tumores de la familia del sarcoma Ewing (ESFT) (Benini S. *et al Int J Cancer* 108 (3): 358-66, 2.004; Liu LZ *et al . Cancer Res.* 67 (13): 6325-32, 2007). La elevada expresión de estas enzimas de señalización que incluyen PDK1 en respuesta a los terapéuticos contra el cáncer también ha sido reportado (Kawaguchi W, *et al.: Cancer de Sci* 98 (12): 2002-2008, 2007, Liu SQ, *et al Dig Liver Dis.* de mayo de 2006; 38 (5): 310-318, 2.006). La inhibición de la PDK1 y MAPK en combinación con fármacos contra el cáncer en ESFT ha sido una estrategia muy exitosa en el desarrollo de los terapéuticos del cáncer (Yamamoto T, *et al J Cancer Res Clin Oncol* 135 (8): 1125-1136, 2009).

(m) Aumento en la expresión de Caspasa 12: Esta pertenece a la amplia familia de cisteína proteasas que son mediadores importantes de la apoptosis específica a estrés ER. Aunque el estrés ER no es conocido por ser un componente importante en EWS, se postula que el tratamiento con CoQ10 desencadena el estrés ER. Estudios previos con agentes anti-cáncer, tales como cisplatino han demostrado conducir a un aumento de la caspasa 12 mediada por la apoptosis específica de estrés ER (Liu H, *et al. J Am Soc Nephrol.* 16 (7): 1985-1992, 2005).

(n) Aumento de la expresión de la fosfolipasa D1: Esta es una fosfatidilcolina específica a fosfolipasa D que está involucrada en los eventos de señalización que regulan la mitosis/ proliferación celular y el tráfico de membrana. Un estudio que involucra más expresión y ARNi atenuado de la EWS / FLI o FLI demuestra que sólo la expresión del gen PLD2 y no la PLD1 se altera (Kikuchi R, *et al Oncogene* 26 (12): 1802-10, 2007). También se muestra que el promotor 5' en el gen PLD1 carece de la secuencia de unión para las proteínas de fusión EWS/FLI. Sin embargo

202
201

PLD1 se ha mostrado ser esencial para la supervivencia celular y la protección de la apoptosis. La división de PLD1 por las caspasas promueve la apoptosis a través de la modulación de p53 dependiente de las vías de muerte celular (YH Jang et al *Cell Death Differ* 15 (11): 1782/93, 2008).

5

(o) Incremento en la expresión de p34 cdc2 quinasa p34 y BPL: La p34cdc2 es una quinasa que regula la entrada de las células en la fase M. la activación prematura de p34cdc2 provoca la detención del ciclo celular y inicio de apoptosis. Los agentes contra el cáncer, como el taxol inducen una activación prematura de p34cdc2 que lleva a apoptosis en EWS (Duan, H., et al, 2005; Lee S., et al *Cancer Res.* 62 (20): 5703-10, 2002). Un aumento en p34cdc2 y la expresión de proteína de unión (p34 BPL) en respuesta a CoQ10 sugiere un aumento en la actividad apoptótica inducida por CoQ10 en las células NCI0808.

10

15

(p) Incremento en la expresión de la cinasa de tirosina agammaglobulinemia Bruton (BTK): El BTK está implicado en la activación de la fosfolipasa $\gamma 2$, que conduce a la liberación de calcio intracelular, la entrada de calcio extracelular y la activación de PKC. BTK se ha reportado por unir directamente e interactuar con la proteína EWS (Bajpai UD, et al *J Exp Med* 191 (10): 1735-1744, 2000), aunque no se conoce su papel exacto en el EWS. Ya que el BTK activa PKC se sugiere que median la apoptosis desencadenada por calcio en las células cancerosas (Zhu, DM, et al *Clin Cancer Res*, 5. 355 - 360, 1999).

20

25

(q) Aumento en la expresión de ASC2: La apoptosis asociada con mancha similar a proteína que contiene un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) - pertenece a la clase de proteínas que contienen dominios pirina y son componentes clave de las rutas que regulan la inflamación, la apoptosis y el procesamiento de citocinas. Estas proteínas utilizan el dominio pirina para activar NFkB y caspasa 1 (Stehlik C, et al *Biochem J.* 373 (Pt 1). 101, 2003). Se propone que estas proteínas están involucradas en la mediación de la apoptosis en NCI0808 en respuesta a CoQ10.

30

35

(r) Aumento en la expresión de BubR1: BubR1 sirve como un punto de control mitótico de la serina/treonina proteína quinasa que es esencial para la regulación de complejos de promoción de anafase (APC / C) (Choi et al

208
207

2009). La alteración de esta proteína provoca la detección mitótica y la apoptosis de las células cancerosas (HZ Xu, *et al. Cell Cycle* .9 (14): 2897-907, 2010). Se ha descrito el punto de control fusiforme en muchas formas de cáncer y una expresión incrementada de BubR1 es probable que sea consistente con la respuesta al CoQ10.

(s) Aumento en la expresión de PCAF: PCAF es una enzima histona acetil transferasa que acetila las proteínas histonas y no histonas. Está implicada en la mediación de una variedad de funciones incluyendo la apoptosis.

(t) Aumento en la expresión de Raf1: Raf1 es un proto-oncogen y funciona como una quinasa serina treonina proteína que regula la fase la salida G2/M del ciclo celular. Está implicada en la transducción de señales mitogénicas de la membrana celular al núcleo, representa un subconjunto de la ruta de señalización dependiente Ras de los receptores al núcleo.

(u) Incremento en la expresión de MSK1: MSK1 es un mitógeno y proteína quinasa 1, activada por que está directamente activadas por MAPK y SAPK/p38 y a su vez puede activar las proteínas CREB (Deak M, *et al EMBO J.* 17 (15): 4426-41, 1998). La supresión de CREB activa induce la apoptosis e inhibe el crecimiento celular en humanos no cáncer de pulmón de células no microcítica.

(v) Aumento de la expresión de SNAP25: La proteína SNAP-25 es un componente del complejo SNARE, y está involucrado en el montaje de canales en la membrana neuronal presináptica. Las proteínas quiméricas EWS/FLI inhiben la diferenciación neuronal y la expresión de SNAP25 al regular Brn-3a, un factor de transcripción que regula SNAP25 (Gascoyne DM, *et al. Oncogene.* 23 (21): 3830-40, 2004). CoQ10 puede inhibir la actividad de la proteína EWS/Fli quimérica en células NCIES 0808. tratadas.

(v) Disminución de la expresión del mTOR: los mamíferos objetivo de rapamicina también conocido como objetivo mecanicista de rapamicina o proteína de unión FK506 12-rapamicina proteína asociada 1 (FRAP1) es una proteína que en humanos está codificada por el gen FRAP1 (Brown EJ, *et al. Nature* 369 (6483): 756-8, 1994; Moore PA, *et al Genomics* 33 (2): 331-2, 1996). El mTOR es una

209
208

proteína quinasa de serina/treonina que regula el crecimiento celular, proliferación celular, motilidad celular, supervivencia celular, síntesis de proteínas, transcripción y pertenece a la fosfatidilinositol 3-quinasa relacionada con la familia de proteínas quinasa (Hay N, *et al. Genes Dev.* 18 (16): 1926-45, 2004; Beevers C, *et al Int J*
5 *Cancer* 119 (4): 757-64, 2006). E mTOR desempeña un papel central en la señalización provocada por los nutrientes y los mitógenos como factores de crecimiento para regular la traducción. El mTOR integra la entrada de las rutas ascendentes, que incluyen insulina, factores de crecimiento (tales como IGF-1 e IGF-2) y mitógenos. El mTOR también percibe nutrientes celulares y los niveles de
10 energía y el estado de óxido-reducción (Hay N, *et al.* 2004). Dado su papel fundamental en el estado metabólico/ bioenergético de la regulación celular y la observación de que la desregulación de mTOR se asocia con el cáncer, la disminución en la expresión de la proteína mTOR en respuesta a CoQ10 en la estirpe celular NCIES 0808 es indicativa de su capacidad para influir el estado
15 metabólico/ bioenergético el sarcoma de Ewing.

Ejemplo 9: Método de preparar un lote de 0,5 kg de crema de CoQ10 3% que incluye Concentrado CoQ10 21% y el benzoato de alquilo

20 Un lote de 0.5 kg de crema de CoQ10 3,0% de composición se prepara al combinar las siguientes fases. Fase A incluye benzoato de alquilo C₁₂₋₁₅ a 4.00 %p/p, alcohol cetílico NF a 2.00% p/p, estearato de glicerilo /PEG-estearato 100 a 4.50% p/p y alcohol estearílico NF en el 1.5% p/p. Los porcentajes y cantidades se muestran en la tabla siguiente.

25

Fase	Nombre comercial	Nombre CTFA	Porcentage	Cantidad (kg)
A	CAPRYLIC	Benzoato de alquilo C ₁₂₋₁₅	4.000	0.0200
A	RITA CA	ALCOHOL CETÍLICO	2.000	0.0100
A	RITA SA	ALCOHOL ESTEARÍLICO	1.500	0.0075
A	RITAPRO 165	ESTEARATO DE GLICERILO Y PEG- 100ESTEARATO	4.500	0.0225

Tabla 47

La Fase B incluyen dietilenglicol monoetil éter NF a 5.00%p/p, USP glicerina a 2.00%p/p, propilenglicol USP a 1.50%p/p, fenoxietanol NF a
30 0.475%p/p, agua purificada USP a 16.725%p/p y Dispersión de Carbómero, 2% a

110
209

40%p/p. Los porcentajes y cantidades se muestran en la tabla de fase correspondiente a continuación.

Fase	Nombre comercial	Nombre CTFA	Porcentage	Cantidad (kg)
B	RITA GLICERINA	GLICERINA	2.000	0.0100
B	PROPILENGLICOL	PROPILENGLICOL	1.500	0.0075
B	TRANSCUTOL P	ETOXIDIGLICOL	5.000	0.0250
B	FENOXIETANOL	FENOXIETANOL	0.475	0.0024
B	ACRITAMER 940, 2% DE DISPERSIÓN	AGUA FENOXIETANOL PROPILENGLICOL CARBÓMERO	40.000	0.2000
B	AGUA PURIFICADA, USP	AGUA	16.275	0.0836

TABLA 48

5

La fase C incluye ácido láctico USP a 0.50%p/p, solución de lactato de sodio USP a 2.00%p/p, trietanolamina NF a 1.30%p/p y agua purificada USP a 2.50%p/p. Los porcentajes, cantidades y otros detalles se muestran en la tabla siguiente.

Fase	Nombre comercial	Nombre CTFA	Porcentage	Cantidad (kg)
C	TEALAN 99%	TRIETANOLAMINA	1.300	0.0065
C	RITALAC LA	ÁCIDO LÁCTICO	0.500	0.0025
C	RITALAC NAL	LACTATO DE SODIO AGUA	2.000	0.0100
C	AGUA PURIFICADA, USP	AGUA	2.500	0.0125

Tabla 49

10

La Fase D incluye dióxido de titanio USP a 100%p/p, mientras que la fase E incluye concentrado CoQ10 21% a 15.00%p/p. Los porcentajes, cantidades y otros detalles se muestran en la tabla siguiente.

Fase	Nombre comercial	Nombre CTFA	Porcentage	Cantidad (kg)
D	Dióxido de titanio # 33328	DIÓXIDO DE TITANIO	1.000	0.0050
E	CoQ10 21% CONCENTRADO	PROPILENGLICOL, POLISORBATO 80, AGUA, UBIQUINONA, LECITINA, FENOXIETANOL,	0.500	0.0025

Tabla 50

15

Todos los porcentajes en peso son con respecto al peso de la composición de crema entera CoQ10 3,0%.

Los ingredientes de fase A se agregan a un recipiente adecuado y se calienta entre 70 y 80° C en un baño de agua. Los ingredientes de la Fase B, sin incluir la dispersión de Carbómero, se agregan a un recipiente adecuado y se mezclan. Los ingredientes de la Fase C también se agregan a un recipiente adecuado y después se calientan a entre 70 y 80° C en un baño de agua. El concentrado CoQ10 21% de la fase E se coloca en un recipiente adecuado y se funde entre 50 y 60° C utilizando un baño de agua. Los ingredientes se mezclan cuando sea necesario para asegurar la uniformidad. La dispersión de Carbómero luego se agrega a un recipiente adecuado (tanque de mezcla) y se calienta a entre 70 y 80° C mientras se mezcla. Mientras que los ingredientes se mezclan bien, los ingredientes de la Fase B se agregan a los contenidos del tanque de mezcla mientras se mantiene la temperatura. Los contenidos se mezclan y se homogenizan continuamente. El mezclador se desconecta entonces, sin embargo, la homogenización se mantiene. Mientras que continúa la homogenización continuó, el dióxido de titanio de la fase D se agrega al tanque de mezcla. El mezclador se vuelve entonces y los contenidos se mezclan y homogenizan aún más hasta que esté completamente uniforme y totalmente extendidos (comprobar color). La homogenización luego se detiene y el lote se enfría a 50 y 60° C. El mezclador se desconecta entonces y se agrega CoQ10 21% fundida concentrada al tanque de mezcla. El mezclador se prende posteriormente en los contenidos y se mezclan/recirculan hasta que la dispersión es suave y uniforme. El contenido del tanque de mezcla se enfría entonces a entre 45 y 50° C. El contenido se transfiere luego a un recipiente adecuado para el almacenamiento hasta el desempaque.

Ejemplo 10: Tratamiento de los tumores del sarcoma de Ewing in vivo.

30

Los experimentos se llevan a cabo para evaluar la eficacia de un tratamiento tópico con coenzima Q10 para los tumores de sarcoma de Ewing in vivo en un modelo animal. Una o más de las siguientes estirpes celulares de sarcoma de Ewing se utilizan en estos experimentos: TC71, TC32, RD-ES, 5838, A4573, EWS-925, NCI-EWS-94, y NCI-EWS-95 (Kontny HU *et al.*, Simultaneous expresión of Fas and nonfunctional Ligando Fas in Ewings's sarcoma. Cancer Res 1998;58:5842-9). Las estirpes celulares NCI-EWS-011 y NCI-EWS-021 se han generado en el National Cancer Institute a partir de tejido tumoral obtenido a partir

288
211

de los sarcomas de Ewing recidivante. Tanto los tumores resecados y las estirpes celulares generadas son positivas para el translocación t(11, 22) EWS/FLI-1. La estirpe de rhabdomyosarcoma RD4A (Kalebic T, *et al.*, Metastatic human rhabdomyosarcoma: molecular, cellular and cytogenetic analysis of a novel cellular model, Invasion Metastasis 1996; 16:83-96) y las estirpes celulares de neuroblastoma CHP-212 y KCNR (Thiele C. Neuroblastoma. In: Masters J, Palsson B, editors. Human cell culture. Vol 1. Boston (MA): Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 21-53) se utilizan como controles negativos. Las estirpes celulares se cultivan en medio RPMI-1640 complementado con 2 M L-glutamina y 0.1% o 10% de suero fetal bovino (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Las células tumorales se cultivan a una confluencia del 75%, se cosechan con tripsina/EDTA, y después se lavan dos veces con PBS. Dos millones de células del sarcoma de Ewing se inyectan en el 100 µl de PBS en ratones SCID / bg hembras de 4 - a 8 semanas de edad, gemelos (Taconic, Germantown, NY). Cada ratón generalmente desarrolla un solo tumor palpable, evidente en 21-28 días después de la inoculación. En un volumen tumoral de 100-500 mm³, los ratones que son asignados aleatoriamente para recibir coenzima Q10 tópica en dosis diversas como se describe aquí (por ejemplo, 0.01 a 0.5 miligramos de la coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel o el equivalente apropiado para la administración a los ratones) o vehículo solo (5 ó 10 ratones por grupo). La dosis tópica de coenzima Q10 se administran a los ratones en una administración única o múltiple (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más) ciclos o rondas de administración. Se miden las dimensiones del tumor cada 1 o 2 días con calibradores digitales para obtener dos diámetros de la esfera del tumor. El volumen de extremidad inferior en el sitio del tumor se determina por la fórmula $(D \times d^2/6) \times \pi$, donde D es el diámetro más largo y d es el diámetro más corto. Los volúmenes más bajos de las extremidades sin tumor son aproximadamente 50 mm³. Las dimensiones del tumor se comparan con el tiempo en ratones tratados tópicamente con coenzima Q10 y con el vehículo solo para evaluar la eficacia de la coenzima Q10 en inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorales del sarcoma de Ewing *in vivo*.

Referencias

- Araya N., *et al.* Journal of Biological Chemistry. 278:5427-5432, 2003.
 Avantaggiati ML, *et al.* Cell 89: 1175-1184, 1997.
 Bajpai UD, *et al.* J Exp Med. 191(10): 1735-44, 2000.
 Beevers C, *et al.* Int J Cancer 119 (4): 757-64, 2006.

- Benini S. et al. *Int J Cancer*. 108(3):358-66, 2004.
- Brown EJ, et al. *Nature* 369 (6483): 756-8, 1994.
- Buchwald M, et al. *Cancer Letters*. 280: 160-167, 2009.
- Choi E, Choe H, Min J, Choi JY, Kim J, Lee H: *EMBO J*. 28(14):2077-89, 2009.
- 5 Chrivia JC, et al. *Nature* 365:855-859, 1995.
- Cohen HY, et al. *Mol Cell*. 2004 Mar 12;13(5):627-38.
- Deak M, et al. *EMBO J*. 17(15):4426-41, 1998.
- Deveraux, Q.L. et al. *Nature* 388: 300-304, 1997.
- Duan H, et al. " *Molecular and Cellular Biology*. 25(5): 1608-1619, 2005.
- 10 Drexler HCA. *Apoptosis* 3: 1-7, 1998.
- Eckner R, et al. *Genes & Development*. 8(8): 869-84, 1994.
- Fujimura Y, et al.. *Oncogene* 12(1): 159-167, 1996.
- Gascoyne DM, et al. *Oncogene*. 23(21):3830-40, 2004.
- Giaccia, A.J., et al. *Genes & Development* 12, 2973-2983, 1998.
- 15 Giannakou ME, et al. *Trends Cell Biol*. 14(8):408-12, 2004.
- Goodman RH et al. *Genes and Development*. 14: 1553-1577, 2000.
- Gu W, et al. *Nature* 387:819-823, 1997.
- Hay N, et al. *Genes Dev* 18 (16): 1926-45, 2004.
- Hirano G, et al. *Mol Cancer Res*. 8(6):864-72, 2010.
- 20 Holcik M, et al. *Molecular Cell Biology* 23(l):280-8, 2003.
- Jang YH, et al : *Cell Death Differ*. 15(11): 1782-93, 2008.
- Janknecht R. " *Histology and Histopathology*. 17:657-668, 2002.
- Kawaguchi W, et al: *Cancer Sci*. 98(12):2002-2008, 2007.
- Kikuchi R, et al. *Oncogene*. 26(12): 1802-10, 2007.
- 25 Kim JS, et al. *Experimental Molecular Med*. 37(6):575-87, 2005.
- Kinchen JM, et al. *Nature*. 464(7289):778-82, 2010.
- Kummar S, et al. *Br J Cancer*. 86(12): 1884-7, 2002.
- Lee S., et al. *Cancer Res*. 62(20):5703-10, 2002.
- Levine, A.J. *Cell* 88, 323-331 1997.
- 30 Lill N Lef al. *Nature* 387:823-827, 1997.
- Lm H, et I. *J Am Soc Nephrol*. 16(7): 1985-92, 2005.
- Liu LZ et al. *Cancer Res*. 67(13):6325-32, 2007.
- Liu SQ, et al. *Dig Liver Dis*. 2006 May;38(5):310-318, 2006.
- Liu X, et al. *Cell Signaling* 20(1): 230-240, 2008.
- 35 Lizard-Nacol S, et al. : *Tumour Biol*. 13(l-2):36-43, 1992.
- Lo BK, et al. *Am J Pathol*. 176(5):2435-46, 2010.
- Mills JC, et al. *Journal of Cell Biology* 146:703-707, 1999.
- Mizote I, et al. *J Mol Cell Cardiol*. 48(2):302-9, 2010.

- Moore PA, et al.. Genomics 33 (2): 331-2, 1996.
- Mounier N, et al . Cell Stress and Chaperons 7(2): 167-176, 2002.
- Nakajima T, et al . Cell. 90(6): 1107-12, 1997.
- Nakamura Y: Cancer Sci. 95(1):7-11, 2004.
- 5 Pawalak G, et al. Current Opinions in Genetics & Development. 11 :41-47, 2001.
- Piedimonte G, et al. Experimental Cell Research 248:381-390, 1999.
- Pontarin G, Vet al : Proc Natl Acad Sci U S A. 105(46): 17801-6, 2008.
- Rossow KL et all 61(6): 2690-2695, 2001.
- Ramakrishnan R,et al.. Oncogene. 23(42): 7087-7094, 2004.
- 10 Rathaus M, et al .Cell Cycle 8(12): 1843-52, 2009
- Robitaille H, et al . J Invest Dermatol. 2009 Aug 13.
- Seo H-W,ei al. FEBS Letters 583:55-60, 2009.
- Stehlik C, et al. Biochem J. 373(Pt 1): 101, 2003.
- Toretsky JA, et al. Cancer Research. 66(11): 5574-5581, 2006.
- 15 Wojcik C. Cellular and Molecular Life Sciences 56:908-917, 1999.
- Xu HZ, et al : Cell Cycle. 9(14):2897-907, 2010.
- Yamaguchi H, et al. Journal of Biological Chemistry. 284(17): 11171-11183, 2009.
- Yamaguchi T, et al. Cancer Res. 2001 Nov 15;61(22):8256-62.
- Yamamoto T, et al : J Cancer Res Clin Oncol. 135(8): 1125-36, 2009.
- 20 Yap DBS, et al . Oncogene 18:7681-7689, 1999.
- Ying MZ, et al. Cancer Biol Ther. 2010 Feb 25;9(4).
- Zhu, D-M., et al. Clin. Cancer Res., 5: 355-360, 1999.
- Zinszner, H.; et al. Genes & Development 8(21), 2513-26, 1994

25 **Equivalentes:**

Aquellos expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades y métodos específicos descritos aquí. Tales equivalentes están

30 destinados a ser abarcados por el alcance de las siguientes reivindicaciones

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5 1. Un método para tratar o prevenir un sarcoma en un humano, que comprende:
 administrar tópicamente una molécula de Coenzima Q10 al humano de tal manera que ocurre el tratamiento o prevención.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la administración tópica es a través de una dosis seleccionada para proporcionar eficacia en humanos para el sarcoma que se va a tratar.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde el sarcoma que se va a tratar no es un sarcoma típicamente tratado a través de administración tópica con la expectativa de suministro sistémico y de un agente activo en niveles terapéuticamente efectivos.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de dicha molécula de Coenzima Q10 en los tejidos de los humanos que se tratan es diferente a aquella de un estándar de control de tejido humano representativo de un estado saludable o normal.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en donde la forma de dicha molécula de Coenzima Q10 que se administra al humano es diferente de la forma predominante encontrada en la circulación sistémica dentro del humano.
- 30 6. El método de una cualquiera de reivindicaciones 1-5, en donde ocurre el tratamiento a través de una interacción de la molécula de Coenzima Q10 con un gen seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1),
 35 Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1,

proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, fosfatasa ácida 1, inhibidor de
 unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), ribosomal
 proteína P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo,
 proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta,
 5 lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque
 térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica
 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3;
 (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor
 de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina
 10 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor
 de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf
 pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana
 Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP
 15 C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP
 C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente
 de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido
 ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de
 señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3
 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10
 20 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de
 cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo
 T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A (Chaperonina que contiene
 TCP1), Ubiquitina que activa enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1,
 Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta
 25 Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de
 retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de
 elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene
 TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte
 Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasa 6 (MMP-
 30 6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB,
 CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R,
 INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1,
 Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1,
 ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF,
 35 HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21
 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4
 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2,
 bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3,

independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

- 5 **7.** El método de la reivindicación 2, en donde la molécula se aplica a la Coenzima Q10 en un vehículo tópico a un tejido específico en una dosis en el rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 miligramos de la Coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel.
- 10 **8.** El método de la reivindicación 2, en donde la molécula se aplica a la Coenzima Q10 en un vehículo tópico a un tejido específico en una dosis en el rango de aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.15 miligramos de la Coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel.
- 15 **9.** El método de la reivindicación 2, en donde la molécula se aplica a la Coenzima Q10 en un vehículo tópico a un tejido específico en una dosis de aproximadamente 0.12 miligramos de la Coenzima Q10 por centímetro cuadrado de piel.
- 20 **10.** El método de la reivindicación 1, en donde el sarcoma es un tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing.
- 11.** El método de la reivindicación 10, en donde el tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing es sarcoma de Ewing.
- 25 **12.** Un método para inhibir la actividad de la proteína de fusión EWS-FLI1 en un humano que comprende:
- seleccionar un sujeto humano que sufre de un sarcoma, y
- administrar a dicho humano una cantidad terapéuticamente efectiva
- 30 de una molécula de Coenzima Q10, inhibiendo de esta forma la actividad de la proteína de fusión EWS-FLI1.
- 13.** Un método para tratar o prevenir un sarcoma en un humano, que comprende:
- 35 administrar una molécula de Coenzima Q10 a un humano en necesidad de este en un régimen de dosificación de tal manera que la permeabilidad de las membranas celulares del humano se modula y ocurre tratamiento o prevención.

14. El método de una cualquiera de reivindicaciones 1-5 y 8-13, que comprende adicionalmente:

Regular en forma ascendente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, proteína asociada a microtúbulo, beta tubulina, proteasoma alfa 3, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, proteína de choque térmico 27kD, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, y receptor de secuencia de señal 1 delta, ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R, INPPL1, IRS2 y VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK, ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSK1, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF, HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), y MRP1; y/o

regular de forma descendente el nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, fosfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción

eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3 (homólogo 2 de canopia), enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Neurolisina (NLN)-dominio catalítico, Neurolisina (NLN), MDC1, Laminina 2 a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3, independencia de factor de Crecimiento a, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y Apaf1.

15. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el tratamiento ocurre a través de una interacción de dicha molécula de Coenzima Q10 con un gen seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1, aSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6A (Factor de Iniciación Eucariótica 4A11), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a Translina, Arsenita que trasloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A, proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, homólogo de supresor SMT 3 de mif dos 3 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5, PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Receptor de Fosfatidilserina, Péptido de Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200, Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX, FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2, Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido

ER raft 2 asociado a isoforma 1 (beta actina), receptor de secuencia de
 señal 1 delta, factor de iniciación de traducción Eucariótica 3, subunidad 3
 gama, Bilverdin reductasa A (Transaldolasa 1), Queratina 1,10
 (Paratimosina), omega GST 1, Conjugación de Quinona Dopamina de
 5 cadena B a Dj-1, Activador Reg de Proteasoma (alfa), proteína de complejo
 T 1 isoforma A, Tapasina ERP57 de Cadena A(Chaperonina que contiene
 TCP1), enzima que activa Ubiquitina E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1,
 Proteína de choque térmico 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta
 Actina), Proteína de choque térmico 70kd, proteína de unión de
 10 retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de unión de ADN TAR, factor de
 elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, chaperonina que contiene
 TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2, enzima que convierte
 Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz Metaloproteinasea 6 (MMP-
 6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y Neurolisina (NLN), ADRB,
 15 CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR, GPD1, HMOX1, IL4R,
 INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc.c putativa 1, PDK 1,
 Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BPI, BTK, ASC2, BUBRI,
 ARTS, PCAF, Rafl, MSKI, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD, HAT1, PSF,
 HDAC1, Radl7, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2, Cdc 6, P21
 20 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65, TAP, Par4
 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2 a2,
 bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona h3,
 independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2, Kaiso,
 Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y
 25 Apaf1.

16. El método de una cualquiera de reivindicaciones 1-15, que comprende
 adicionalmente un régimen de tratamiento seleccionado del grupo que
 30 consiste de cirugía, radiación, terapia hormonal, terapia con anticuerpo,
 terapia con factores de crecimiento, citocinas, quimioterapia, y terapia con
 citoblasto alogénico.

17. Un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar un sarcoma
 en un sujeto, el método comprende:

35 comparar el nivel de expresión de un marcador presente en una
 primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar por lo menos una
 porción del régimen de tratamiento al sujeto, en donde el marcador se

selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y

el nivel de expresión del marcador presente en una segunda muestra obtenida del sujeto luego de la administración de por lo menos una porción del régimen de tratamiento,

en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la segunda muestra cuando se compara con la primer muestra es una indicación que la terapia es eficaz para tratar el sarcoma en el sujeto.

- 10 **18.** Un método para evaluar si un sujeto está afligido con un sarcoma, el método comprende:

determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y

- 15 comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una
20 indicación que el sujeto está afligido con un sarcoma, por lo tanto evaluar si el sujeto está afligido con un sarcoma.

- 19.** Un método para pronosticar si un sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma, el método comprende:

determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y

- 25 comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una
30 indicación que el sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma, por lo tanto pronosticando si el sujeto está predispuesto a desarrollar un sarcoma.

35

- 20.** Un método para pronosticar la recurrencia de un sarcoma en un sujeto, el método comprende:

determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y

comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una indicación de la recurrencia del sarcoma, pronosticando por lo tanto la recurrencia de un sarcoma en el sujeto.

21. Un método para pronosticar la supervivencia de un sujeto con un sarcoma, el método comprende:

determinar el nivel de expresión de un marcador presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9; y

comparar el nivel de expresión del marcador presente en la muestra biológica obtenida del sujeto con el nivel de expresión del marcador presente en una muestra de control, en donde una modulación en el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica obtenida del sujeto relativa al nivel de expresión del marcador en la muestra de control es una indicación de la supervivencia del sujeto, pronosticando por lo tanto la supervivencia del sujeto con el sarcoma.

22. Un método para monitorear el progreso de un sarcoma en un sujeto, el método comprende:

comparar, el nivel de expresión de un marcador presente en una primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar por lo menos una porción de un régimen de tratamiento al sujeto y el nivel de expresión del marcador presente en una segunda muestra obtenida del sujeto luego de la administración de por lo menos una porción del régimen de tratamiento, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9, monitoreando por lo tanto el progreso del sarcoma en el sujeto.

23. Un método para identificar un compuesto para tratar un sarcoma en un sujeto, el método comprende:

Obtener una muestra biológica del sujeto;

222

poner en contacto la muestra biológica con un compuesto de prueba;
determinar el nivel de expresión de uno o más marcadores presentes
en la muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el marcador se
selecciona del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las
5 Tablas 2-9 con un cambio de pliegue positivo y/o con un cambio de pliegue
negativo;

comparar el nivel de expresión de uno o más marcadores en la
muestra biológica con un control apropiado; y

seleccionar un compuesto de prueba que reduce el nivel de
10 expresión de uno o más marcadores con un cambio de pliegue negativo
presente en la muestra biológica y/o incrementa el nivel de expresión de
uno o más marcadores con un cambio de pliegue positivo presente en la
muestra biológica, identificando por lo tanto un compuesto para tratar el
sarcoma en un sujeto.

15 **24.** El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el
sarcoma es un tipo de sarcoma en tumores de la familia de Ewing.

20 **25.** El método de la reivindicación 24, en donde el tipo de sarcoma en tumores
de la familia de Ewing es sarcoma de Ewing.

26. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde la
muestra comprende un fluido obtenido del sujeto.

25 **27.** El método de la reivindicación 26, en donde el fluido se selecciona del
grupo que consiste de fluidos sanguíneos, vómito, saliva, linfa, líquido
quístico, orina, fluidos recogidos por lavado bronquial, fluidos recogidos por
lavado peritoneal, y fluidos ginecológicos.

30 **28.** El método de la reivindicación 27, en donde la muestra es una muestra de
sangre o un componente de la misma.

29. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde la
muestra comprende un tejido o componente del mismo obtenido del sujeto.

35 **30.** El método de la reivindicación 29, en donde el tejido se selecciona del
grupo que consiste de tejido óseo, conjuntivo, cartílago, pulmón, hígado,
riñón, músculo, corazón, páncreas, y piel.

31. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el sujeto es un humano.
- 5 32. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el nivel de expresión del marcador en la muestra biológica se determina al ensayar un polinucleótido transcrito o una porción del mismo en la muestra.
- 10 33. El método de la reivindicación 32, en donde ensayar el polinucleótido transcrito comprende amplificar el polinucleótido transcrito.
- 15 34. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el nivel de expresión del marcador en la muestra del sujeto se determina al ensayar una proteína o una porción de la misma en la muestra.
- 20 35. El método de la reivindicación 34, en donde la proteína se ensaya utilizando un reactivo que se une específicamente con la proteína.
- 25 36. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el nivel de expresión del marcador en la muestra se determina utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste de reacción de amplificación de reacción de cadena de polimerasa (PCR), análisis PCR de transcriptasa inversa, análisis de polimorfismo de conformación de ADN monocatenario (SSCP), detección de división de emparejamiento errado, análisis heterodúplex, análisis Southern blot, análisis Northern blot, análisis Western blot, hibridación in situ, análisis de matriz, secuenciamiento de ácido desoxirribonucleico, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, y combinaciones o subcombinaciones de los mismos, de dicha muestra.
- 30 37. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el nivel de expresión del marcador en la muestra se determina utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, citometría de flujo, ELISA y espectrometría de masa.
- 35 38. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el marcador es un marcador seleccionado del grupo que consiste de ANGPTL3, CCL2, CDH5, CXCL1, CXCL3, PRMT3, HDAC2, Sintasa de

Óxido Nítrico bNOS, Acetil fosfo Histona H3 AL9 S10, MTA 2, Ácido
 Glutámico Descarboxilasa GAD65 67, KSR, HDAC4, BOB1 OBF1,
 alSintrofina, BAP1, Importina 57, α E-Catenina, Grb2, Bax, subunidad 13 de
 Proteosoma 26S (Endofilina B1), Actina similar 6 A (Factor de Iniciación
 Eucariótica 4 All), proteína de Canal de Cloruro Nuclear, subunidad de
 Proteosoma 26S, Superóxido de Cu/Zn Dismutasa, factor X asociada a
 Translina, Arsenito que transloca ATPasa (Espermina sintetasa), proteína
 SA ribosómica, dCTP pirofosfatasa 1, proteasoma beta 3, proteasoma beta
 4, foasfatasa ácida 1, inhibidor de unión de diazepam, glucoproteína alfa 2-
 HS (Bos Taurus, vaca), proteína ribosómica P2 (RPLP2); histona H2A,
 proteína asociada a microtúbulo, proteasoma alfa 3, factor de elongación de
 traducción eucariótica 1 delta, lamina B1, supresor SMT 3 de mif dos 3
 homólogo 2, proteína de choque térmico 27kD, hnRNP C1/C2, factor de
 elongación de traducción eucariótica 1 beta 2, Similar a HSPC-300, ADN
 dirigido a polimerasa de ADN epsilon 3; (homólogo 2 de canopia), LAMA5,
 PXLDC1, p300 CBP, P53R2, Fosfatidil serine Receptor, Péptido de
 Citoqueratina 17, péptido de Citoqueratina 13, Neurofilamento 160 200,
 Rab5, Filensin, P53R2, MDM2, MSH6, Factor de Choque Térmico 2, AFX,
 FLIPg d, JAB 1, Miosina, MEKK4, cRaf pSer621, FKHR FOXO1a, MDM2,
 Ligando Fas, P53R2, Cadena Liviana Reguladora de Miosina, hnRNP
 C1/C2, Ubiquilina 1 (Fosfatasa 2A), hnRNP C1/C2, glucoproteína alfa 2-HS
 (Bos Taurus, vaca), beta actina, hnRNP C1/C2, proteína de choque térmico
 70kD, beta tubulina, ATP dependiente de helicasa II, factor de elongación
 de traducción eucariótica 1 beta 2, lípido ER raft 2 asociado a isoforma 1
 (beta actina), receptor de secuencia de señal 1 delta, factor de iniciación de
 traducción Eucariótica 3, subunidad 3 gama, Bilverdin reductasa A
 (Transaldolasa 1), Queratina 1,10 (Paratimosina), omega GST 1,
 Conjugación de Quinona Dopamina de cadena B a Dj-1, Activador Reg de
 Proteasoma (alfa), proteína de complejo T 1 isoforma A, Tapasina ERP57
 de Cadena A(Chaperonina que contiene TCP1), Ubiquitina que activa
 enzima E1; Alanil-tARN sintetasa, Dinactina 1, Proteína de choque térmico
 60kd, beta actina, Spermidina sintasa (Beta Actina), Proteína de choque
 térmico 70kd, proteína de unión de retinoblastoma 4 isoforma A, proteína de
 unión de ADN TAR, translación elongación factor 1 beta 2 eucariótica ,
 chaperonina que contiene TCP1, subunidad 3, dineína citoplásmica IC-2,
 enzima que convierte Angiotensina (ACE), Caspasa 3, GARS, Matriz
 Metaloproteinasea 6 (MMP-6), Dominio Catalítico de Neurolisina (NLN), y
 Neurolisina (NLN), ADRB, CEACAM1, DUSP4, FOXC2, FOXP3, GCGR,

5 GPD1, HMOXI, IL4R, INPPL1, IRS2, VEGFA, isoforma sensible a c-myc- c
putativa 1, PDK 1, Caspasa 12, Fosfolipasa D1, P34 cdc2, P53 BP1, BTK,
ASC2, BUBR1, ARTS, PCAF, Raf1, MSKI, SNAP25, APRIL, DAPK, RAIDD,
HATI, PSF, HDAC1, Rad17, Surviving, SLIPR, MAG13, Caspasa 10, Crk2,
10 Cdc 6, P21 WAF 1 Cip 1, ASPP 1, HDAC 4, Ciclina B1, CD 40, GAD 65,
TAP, Par4 (respuesta de apoptosis a próstata 4), MRP1, MDC1, Laminin2
a2, bCatenina, FXR2, Anexina V, SMAC Diablo, MBNL1, Dimetil Histona
h3, independencia de factor de Crecimiento 1, U2AF65, mTOR, E2F2,
Kaiso, Glucógeno Sintasa Cinasa 3, ATF2, HDRP MITR, Neurabina I, API, y
Apaf1.

39. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde se
determina el nivel de expresión de una pluralidad de marcadores.

15 40. El método de una cualquiera de reivindicaciones 17-23, en donde el sujeto
se trata con una terapia seleccionada del grupo que consiste de un
compuesto influenciador de entorno, cirugía, radiación, terapia hormonal,
terapia con anticuerpo, terapia con factores de crecimiento, citocinas,
quimioterapia, terapia con citoblasto alogénico.

20 41. El método de la reivindicación 40, en donde el compuesto influenciador de
entorno es una molécula de Coenzima Q10.

25 42. Un equipo para evaluar la eficacia de una terapia para tratar un sarcoma, el
equipo comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo
menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los
marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del
equipo para evaluar la eficacia de la terapia para tratar el sarcoma.

30 43. Un equipo para evaluar si un sujeto está afligido con un sarcoma, el equipo
comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos
un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores
enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para
evaluar si el sujeto está afligido con el sarcoma.

35 44. Un equipo para pronosticar si un sujeto está predispuesto a desarrollar un
sarcoma, el equipo comprende reactivos para determinar el nivel de
expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que

consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar si el sujeto está predispuesto a desarrollar el sarcoma.

- 5 **45.** Un equipo para pronosticar la recurrencia de un sarcoma en un sujeto, el equipo comprende reactivos para evaluar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la recurrencia del sarcoma.
- 10
- 15 **46.** Un equipo para pronosticar la recurrencia de un sarcoma, el equipo comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la recurrencia del sarcoma.
- 20 **47.** Un equipo para pronosticar la supervivencia de un sujeto con un sarcoma, el equipo comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar la supervivencia del sujeto con el sarcoma.
- 25 **48.** Un equipo para monitorear el progreso de un sarcoma en un sujeto, el equipo comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste de los marcadores enumerados en las Tablas 2-9 e instrucciones para el uso del equipo para pronosticar el progreso del sarcoma en un sujeto.
- 30 **49.** El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, que comprende adicionalmente significa para obtener una muestra biológica de un sujeto.
- 35 **50.** El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, que comprende adicionalmente una muestra de control.
- 51.** El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, en donde los medios para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador comprende medios para ensayar un polinucleótido transcrito o una porción del mismo en la muestra.

52. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, en donde los medios para determinar el nivel de expresión de por lo menos un marcador comprende medios para ensayar una proteína o una porción del misma en la muestra.

53. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, que comprende adicionalmente un compuesto influenciador de entorno.

10 54. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 42-48, en donde el equipo comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de una pluralidad de marcadores.

15

228
228

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA UTILIZANDO UN CAMBIADOR EPIMETABÓLICO (COENZIMA Q10)

RESUMEN

5

Se describen métodos y formulaciones para tratar un sarcoma en humanos utilizando un cambiador epimetabólico, tal como Coenzima Q10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima.

10 También se proporcionan métodos para evaluar la eficacia de tratamiento al diagnosticar, y pronosticar sarcoma.

15

20

25

30

35

230
229

1/11

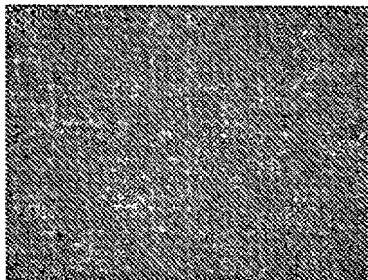


Fig. 1A



Fig. 1B

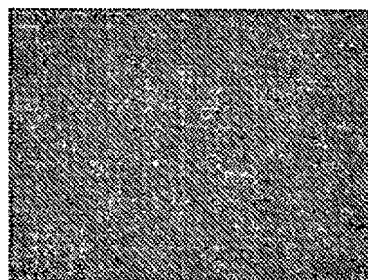


Fig. 1C

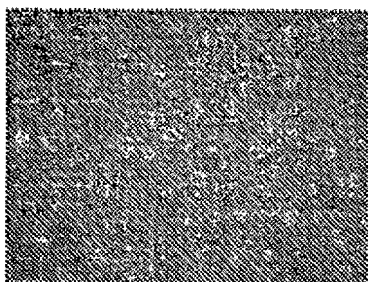


Fig. 1D

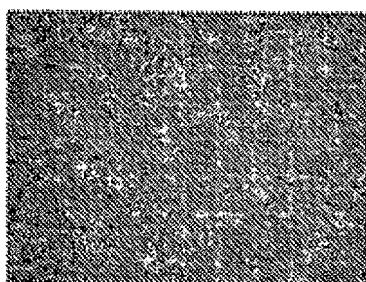


Fig. 1E

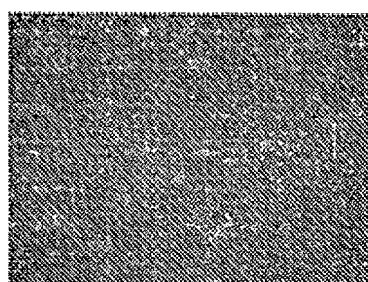


Fig. 1F

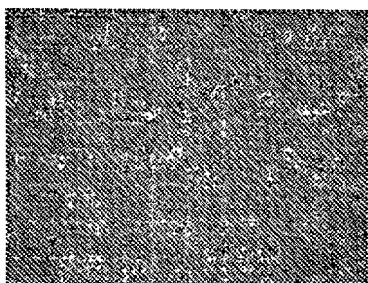


Fig. 1G

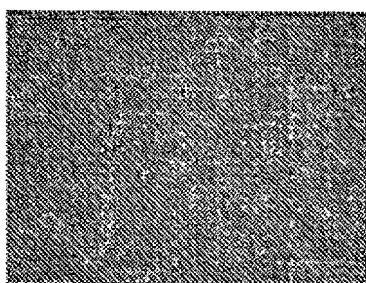


Fig. 1H

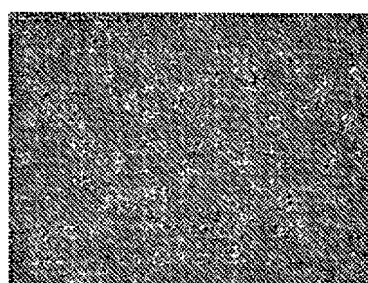


Fig. 1I

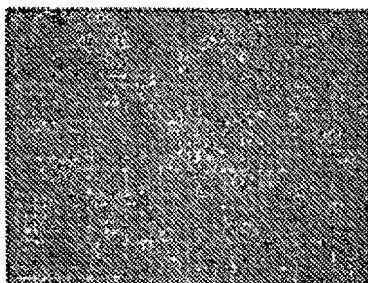


Fig. 1J

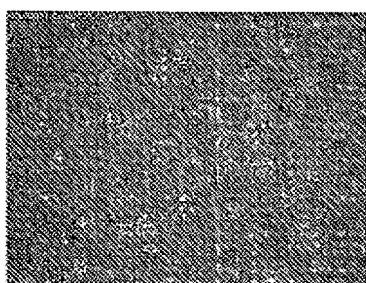


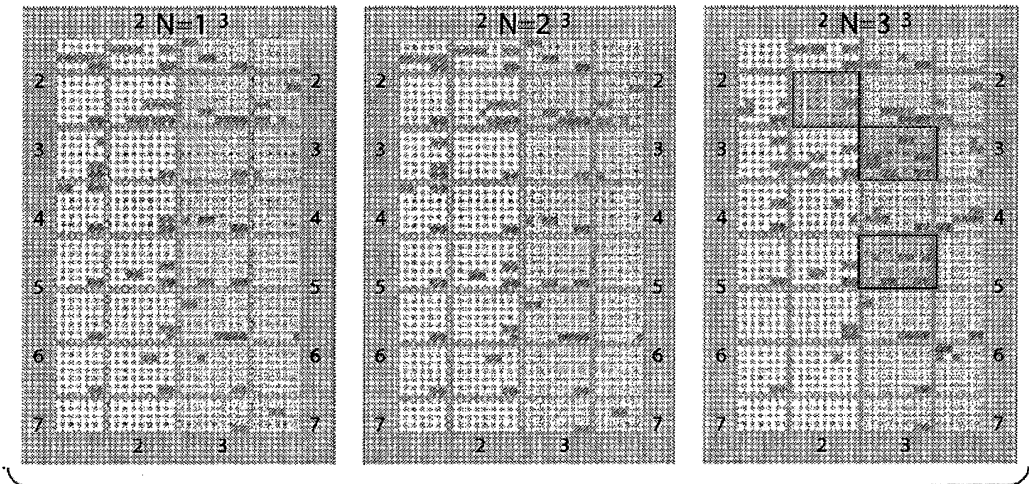
Fig. 1K

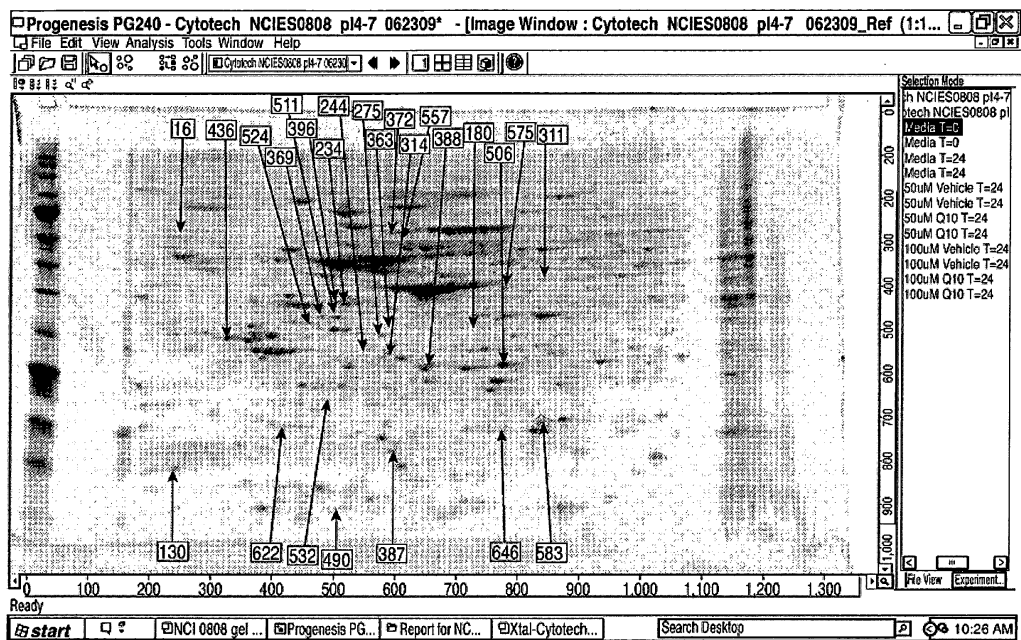


Fig. 1L

2/11

230
231





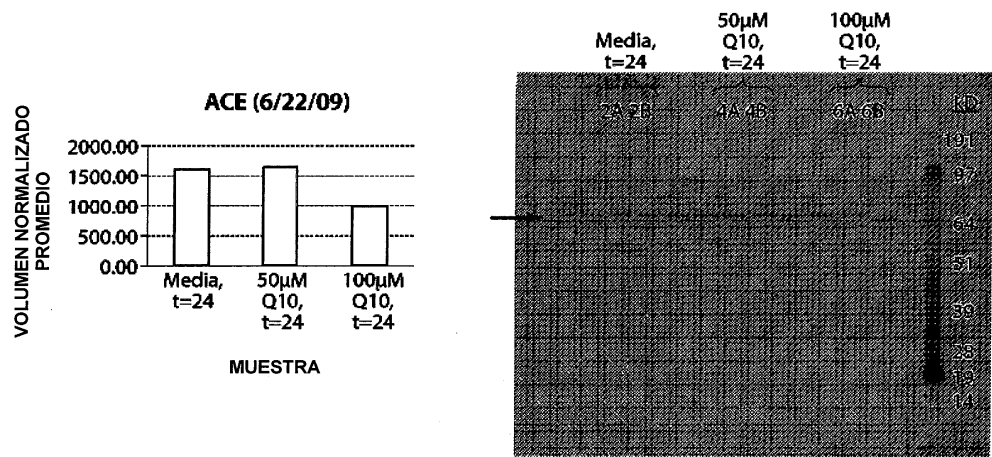


Fig. 4A

232 255

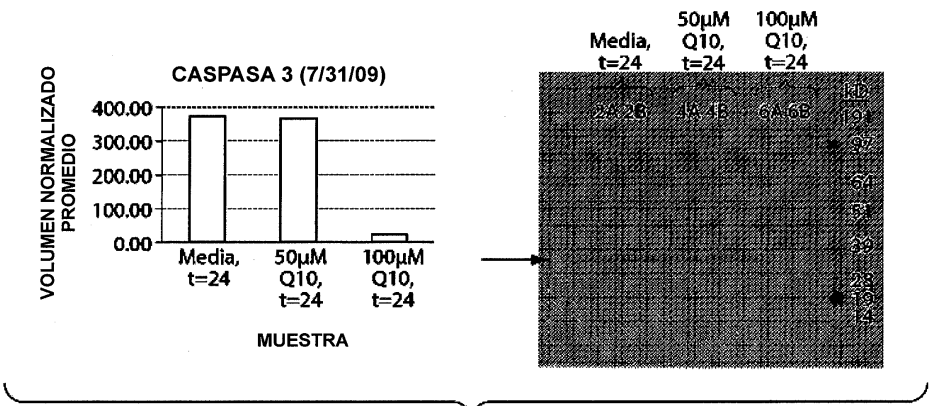


Fig. 4B

233 251

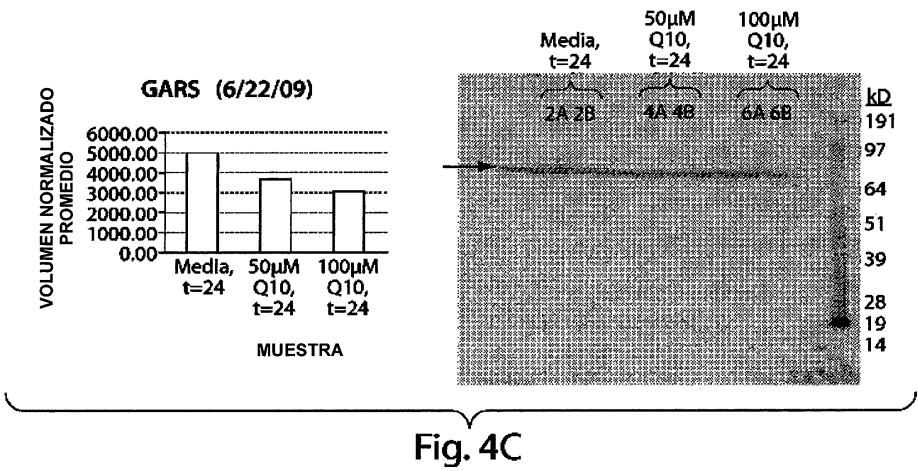


Fig. 4C

23/

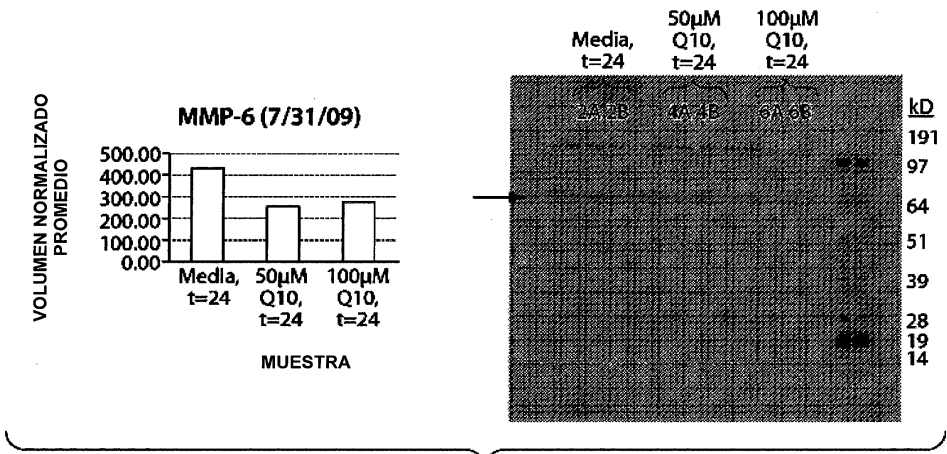


Fig. 4D

235
236

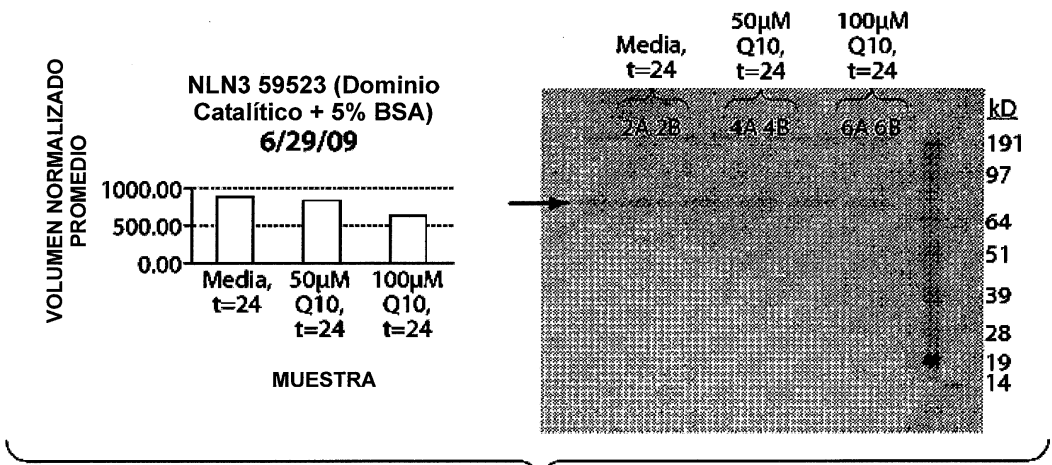


Fig. 4E

237
236

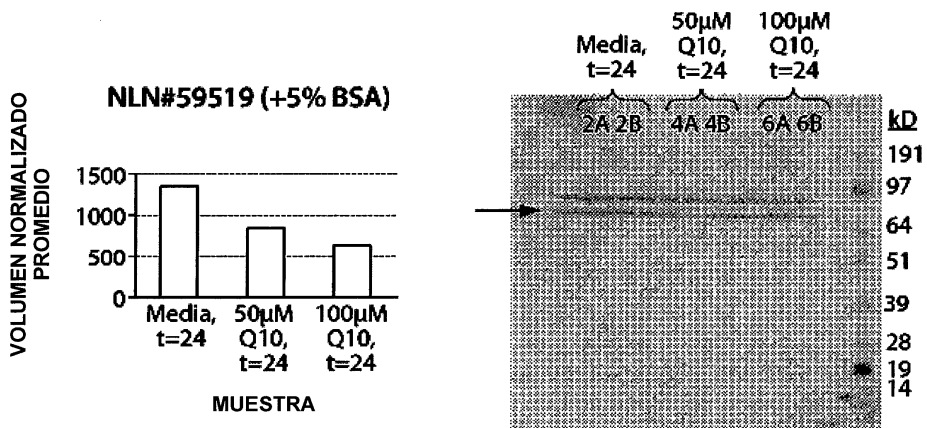


Fig. 4F

25/8

10/11

RED 1,2 FUSIONADA 0

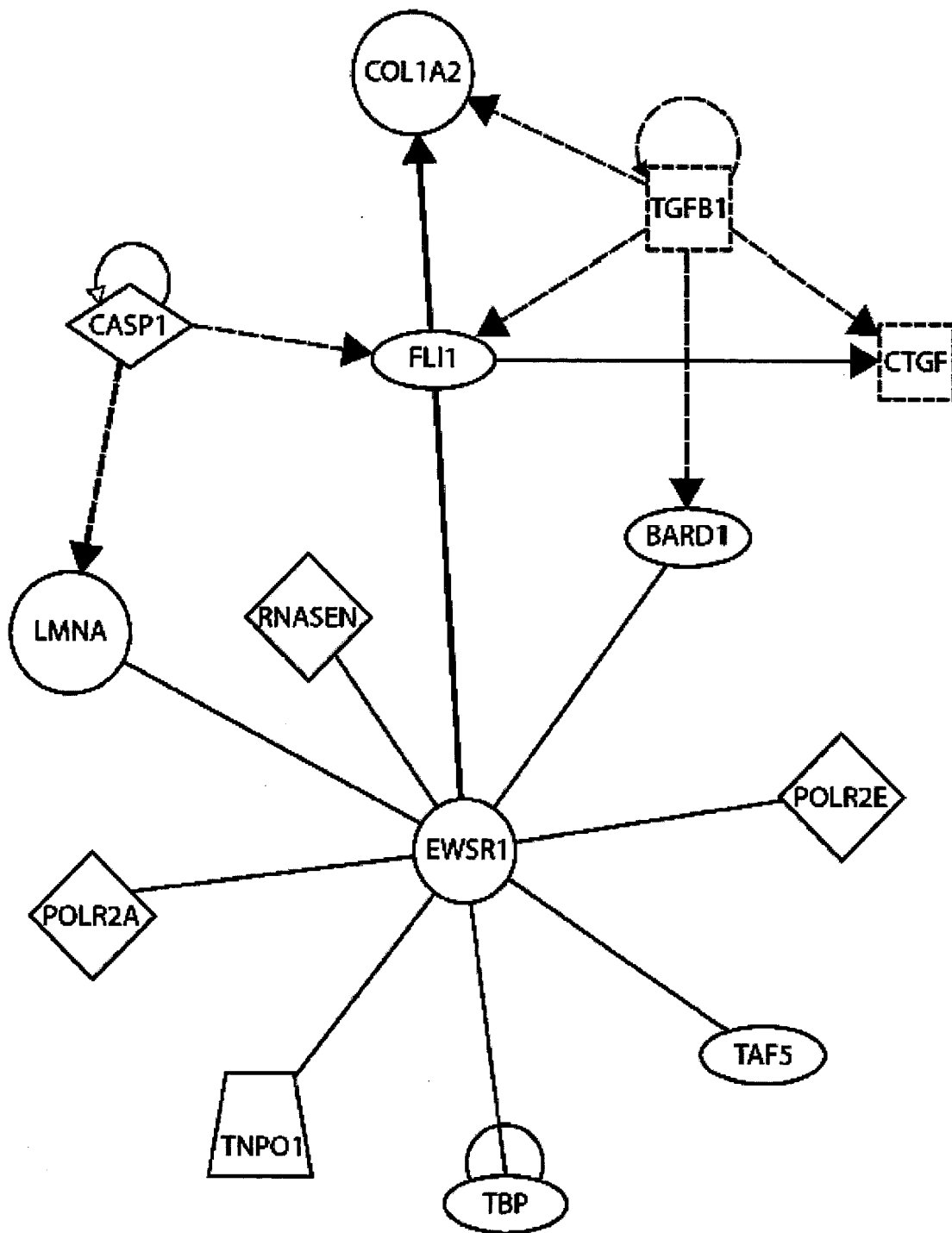


Fig. 5A

240
239

11/11

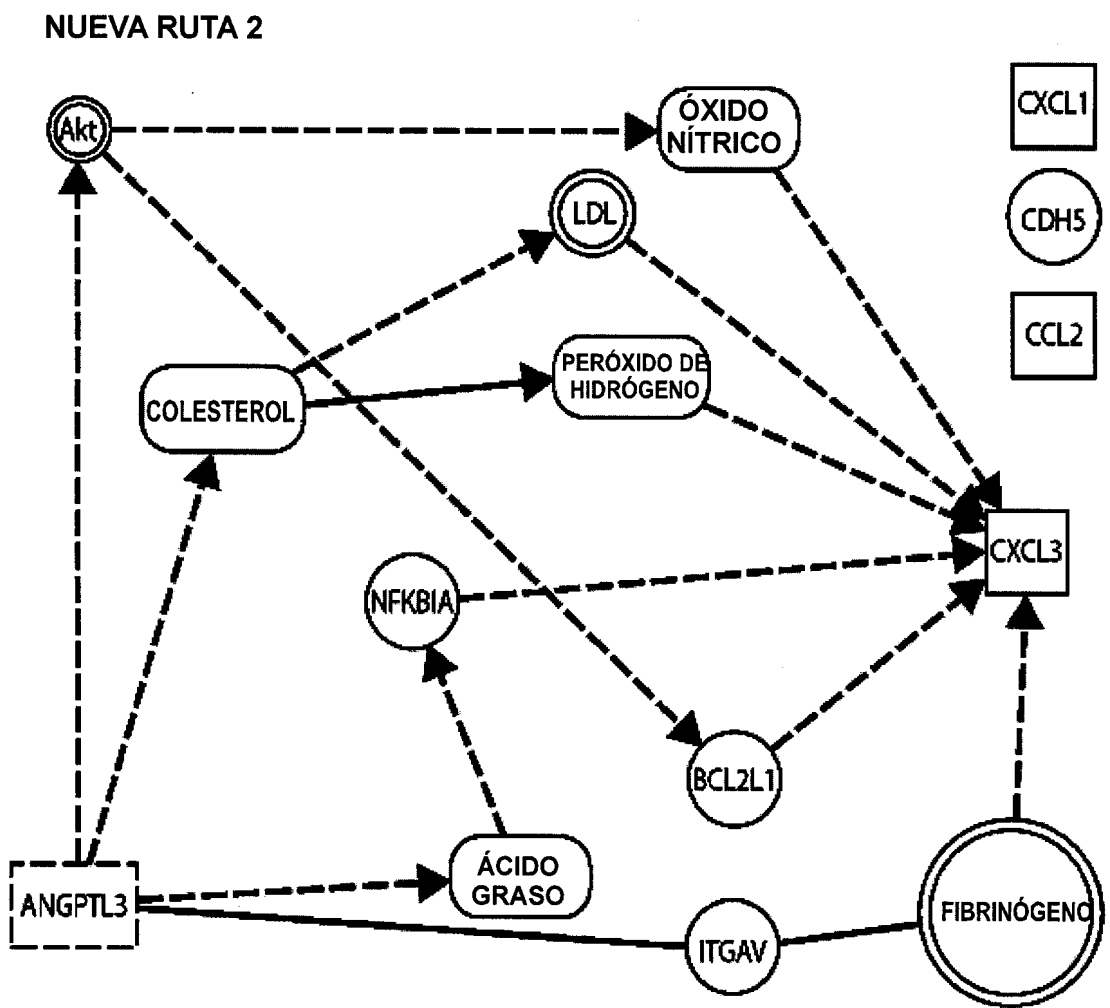


Fig. 5B

247
240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/046711												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
A61K 31/122(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/122; A61K 31/70; A61K 39/395; G01N 33/53; C12Q 1/68; G01N 33/574														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: sarcoma, marker, coenzyme Q10														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 2008-0075722 A1 (DEPINHO, RONALD A. et al.) 27 March 2008 See paragraphs [0069], [0131], [0446]: claims 1-19, 22-31, 36-41, 44-61	42-54												
X	US 2008-0038736 A1 (LLOVET, JOSEP M. et.al.) 14 February 2008 See claims 1, 2, 4-10, 12, 17, 21, 22, 28-33, 53, 54	42-54												
A	US 2009-0041773 A1 (AUKERMAN, SHARON LEA et al.) 12 February 2009 See claims 1, 36, 37, 43, 45, 46	42-54												
A	WO 2000-40749 A2 (LIEW, CHOONG-CHIN) 13 July 2000 See page 19, line 14-21, table 2; claims 1-11, 13-16, 19-23	42-54												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
<table><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 27 MAY 2011 (27.05.2011)		Date of mailing of the international search report 30 MAY 2011 (30.05.2011)												
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Jung Da Won Telephone No. 82-42-481-8147 												

243
242

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/046711

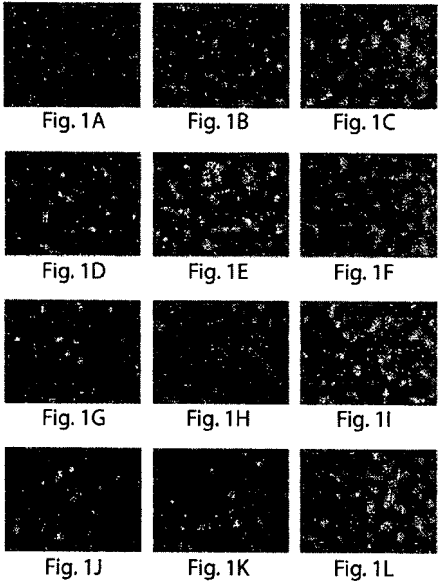
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0075722 A1	27.03.2008	CA 2642342 A1	23.08.2007
		EP 1991701 A2	19.11.2008
		EP 1991701 A4	17.03.2010
		WO 2007-095186 A2	23.08.2007
		WO 2007-095186 A3	30.10.2008
		WO 2007-095186 A8	03.04.2008
US 2008-0038736 A1	14.02.2008	None	
US 2009-0041773 A1	12.02.2009	None	
WO 00-40749 A2	13.07.2000	AU 2000-18536 A1	24.07.2000
		AU 2004-249318 A1	29.12.2004
		CA 2359816 A1	13.07.2000
		CA 2359816 C	03.08.2010
		CA 2530191 A1	29.12.2004
		CA 2588072 A1	26.05.2006
		CA 2702148 A1	13.07.2000
		CN 101415836 A	22.04.2009
		EP 1643893 A2	12.04.2006
		EP 1643893 A4	05.12.2007
		EP 1815020 A2	08.08.2007
		JP 2007-528704 A	18.10.2007
		US 2004-0013663 A1	22.01.2004
		US 2004-0014059 A1	22.01.2004
		US 2004-0037841 A1	26.02.2004
		US 2004-0241726 A1	02.12.2004
		US 2004-0248169 A1	09.12.2004
		US 2004-0265868 A1	30.12.2004
		US 2005-0003394 A1	06.01.2005
		US 2005-0042630 A1	24.02.2005
		US 2005-0191637 A1	01.09.2005
		US 2005-0196762 A1	08.09.2005
		US 2005-0208505 A1	22.09.2005
		US 2007-0031841 A1	08.02.2007
		US 2007-0105121 A1	10.05.2007
		US 2010-092983 A1	15.04.2010
		US 2010-092984 A1	15.04.2010
		US 2010-124745 A1	20.05.2010
		US 2010-203519 A1	12.08.2010
		US 7432049 B2	07.10.2008
		US 7473528 B2	06.01.2009
		US 7598031 B2	06.10.2009
		US 7662558 B2	16.02.2010
		US 7906278 B2	15.03.2011
		WO 2004-112589 A2	29.12.2004
		WO 2006-055524 A3	26.05.2006

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 031/122	
22) Fecha de solicitud:		(71)Solicitante(s) CYTOTECH LABS, LLC	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/236,845	(32) Fecha 25/08/2009	(33) País US
		(72) Inventor(es) RANGAPRASAD SARANGARAJAN Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/03/2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17/03/2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 25/08/2010		N° publicación: WO 2011/031503 A3	
No. de solicitud PCT/US2010/046711			
(54) Titulo: MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE UN SARCOMA UTILIZANDO UN CAMBIADOR EPIMETABÓLICO (COENZIMA Q10)			

Resumen:

Se describen métodos y formulaciones para tratar un sarcoma en humanos utilizando un cambiador epimetabólico, tal como Coenzima Q10, un elemento estructural de CoQ10, un derivado de CoQ10, un análogo de CoQ10, un metabolito de CoQ10, o un intermedio de la ruta de biosíntesis de la coenzima. También se proporcionan métodos para evaluar la eficacia de tratamiento al diagnosticar, y pronosticar sarcoma.

1/11



Sobre
con
Artes

246
245

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0027339	
				Bogotá D.C., Marzo 20 de 2012 - 07:28:36	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803251	16/03/2012	31.650.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			590.000.00	590.000.00
					\$590.000.00
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-049244- -00000-0000 Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 249 Tra. 11 PATENTEIYII Folios: 250 Act. 411 PRESENTACION					
0010:17923-841-003-1					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Marzo 20 de 2012 - 07:28:42					

246

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0027366

Bogotá D.C., Marzo 20 de 2012 - 07:28:36

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803251	16/03/2012	31.650.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE D	960.000.00	960.000.00
				\$960.000.00

SON: **NOVECIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-049244- -00000-0000

Fecha: 2012-03-23 11:59:01
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 249
Act. 411 PRESENTACION
Folios: 250

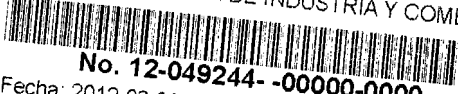
0010:17923-841-003-1.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 20 de 2012 - 07:28:43

148
247

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0024919	
				Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 07:29:37	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157717630	09/03/2012	64.070.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL	300.000.00	300.000.00	
				\$300.000.00	
=====					
SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____ *****					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-049244- -00000-0000 Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Tra. 11 PATENTEIYII Act. 411 PRESENTACION Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Eve: 378 FASENACIONALI Folios: 249 Act. 411 PRESENTACION Folios: 250					
Colo: 17923- 841- 003- 1.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Marzo 12 de 2012 - 07:29:49					

249
248

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0024868	
				Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 07:29:37	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157717630	09/03/2012	64.070.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES			30.000.00	30.000.00
					\$30.000.00
=====					
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-049244- -00000-0000 Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Tra. 11 PATENTEIYII Act. 411 PRESENTACION Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Eve: 378 FASENACIONALI Folios: 249 Act. 411 PRESENTACION Folios: 250					
Q. 17923-841-003-1.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Marzo 12 de 2012 - 07:29:48					

250
249

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0024869	
				Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 07:29:37	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157717630	09/03/2012	64.070.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00	
				\$30.000.00	
=====					
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____ ***** Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-049244- -00000-0000 Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 249 Act. 411 PRESENTACION Folios: 250					
Celo: 17923-841-003-1					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Marzo 12 de 2012 - 07:29:48					



No. 12-049244- -00000-0000

Fecha: 2012-03-23 11:59:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 250

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

IE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐