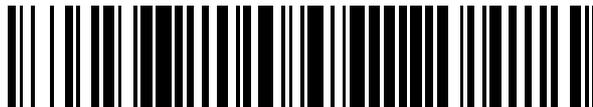


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 837**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2011 PCT/US2011/053681**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12044684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2011 E 11829825 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2621516**

54 Título: **Interferón-beta para su uso como monoterapia o en combinación con otras terapias contra el cáncer**

30 Prioridad:

01.10.2010 US 389009 P

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

27.10.2016

73 Titular/es:

**BIAGEN MA INC. (100.0%)
250 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BAKER, DARREN, P.;
JOSEPH, INGRID, B.J.K. y
WANG, XINZHONG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 587 837 T3

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

DESCRIPCIÓN

Interferón-beta para su uso como monoterapia o en combinación con otras terapias contra el cáncer.

5 CAMPO TÉCNICO

Esta descripción se refiere al uso de un interferón-beta conjugado con polímero como monoterapia o en combinación con otras terapias para tratar el cáncer.

10 ANTECEDENTES

En los seres humanos, los cánceres se establecen después de un evento genético primario mediante una serie de mecanismos que incluyen, pero sin limitación, aumento del metabolismo celular y de la velocidad de crecimiento, estimulación de la angiogénesis, aumentando así el suministro de sangre al tumor, e irregularidad de las rutas de señalización y supresores de tumor. Además, los tumores pueden hacerse resistentes a los fármacos contra el cáncer mediante una serie de mecanismos que incluyen, pero sin limitación, expulsión del fármaco de la célula, aparición de mutaciones que impiden la unión del fármaco a su diana, y aparición de mutaciones adicionales en los genes y sus productos de proteína no relacionados con el fármaco diana. Aunque las terapias contra el cáncer típicamente usan una combinación de fármacos para alcanzar la eficacia, aún existe la necesidad de proporcionar mejores terapias para varios cánceres para los que el pronóstico a largo plazo es malo.

RESUMEN

En base a la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona interferón-beta-1a pegilado para su uso en un método de tratamiento del carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho interferón-beta-1a pegilado a un sujeto en combinación con un inhibidor mitótico.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un inhibidor mitótico para su uso en un método de tratamiento de carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho inhibidor mitótico a un sujeto en combinación con interferón-beta-1a pegilado.

En un aspecto adicional, la invención proporciona interferón-beta-1a pegilado y un inhibidor mitótico para su uso en un método de tratamiento de carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho interferón-beta-1a pegilado y un inhibidor mitótico a un sujeto en combinación.

La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, un método para tratar el melanoma en un sujeto incluye identificar un sujeto diagnosticado con melanoma, administrar un inhibidor de una proteína cinasa en la ruta Ras-Raf-MEK-ERK al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El inhibidor puede ser un inhibidor de MEK. El inhibidor puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el melanoma. El inhibidor puede ser N-[(2R)-2,3-dihidroxipropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodo-fenil)amino]benzamida. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b.

El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado. El IFN-beta o IFN-beta pegilado puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el melanoma.

En otro aspecto, un método para tratar el melanoma en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con melanoma, administrar un agente alquilante al sujeto; y administrar un interferón beta al sujeto. El agente alquilante puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el melanoma. El agente alquilante puede ser 4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de células renales en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de células renales, administrar un anticuerpo anti-VEGF al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El anticuerpo anti-VEGF puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de células renales. El anticuerpo anti-VEGF puede ser un anticuerpo anti-VEGF-A monoclonal humanizado. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón

beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado. El IFN-beta o IFN-beta pegilado puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de células renales.

- 5 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de células renales en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de células renales, administrar un inhibidor de mTOR al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El inhibidor de mTOR puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de células renales. El inhibidor de mTOR puede ser temsirolimus. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 15 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de células renales en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de células renales, administrar un inhibidor de Raf-1 al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El inhibidor de Raf-1 puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de células renales. El inhibidor de Raf-1 puede ser 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 20 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de colon en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de colon, administrar un anticuerpo anti-VEGF al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El anticuerpo anti-VEGF puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de colon. El anticuerpo anti-VEGF puede ser un anticuerpo anti-VEGF-A monoclonal humanizado. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado. El IFN-beta o IFN-beta pegilado puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de colon.

- 30 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de mama en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de mama, administrar un inhibidor mitótico al sujeto y administrar un interferón beta al sujeto. El inhibidor mitótico puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de mama. El inhibidor mitótico puede ser paclitaxel. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado. El IFN-beta o IFN-beta pegilado puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar el carcinoma de mama.

- 35 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de mama en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de mama y administrar un interferón beta al sujeto. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 40 En otro aspecto, un método para tratar el melanoma en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con melanoma y administrar un interferón beta al sujeto. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 45 En otro aspecto, un método para tratar carcinoma de células renales en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de células renales y administrar un interferón beta al sujeto. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 50 En otro aspecto, un método para tratar el carcinoma de colon en un sujeto puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con carcinoma de colon y administrar un interferón beta al sujeto. El interferón beta puede ser interferón beta 1a. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1a pegilado. El interferón beta puede ser interferón beta 1b. El interferón beta 1a puede ser interferón beta 1b pegilado.

- 55 Otras características resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomadas junto con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, las características de diversas realizaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gráfico que ilustra los efectos del control, IFN-beta-1a e IFN-beta-1a pegilado en la formación de vasos sanguíneos inducidos por el tumor en ratones sin pelo inoculados con 2×10^6 células de melanoma humano SK-MEL-1.

5

La figura 2 es un gráfico que ilustra los efectos de diferentes dosis del inhibidor de MEK PD 325901 sobre el volumen de tumor SK-MEL-1 en ratones sin pelo inoculados con células de melanoma humano SK-MEL-1.

La figura 3 es un gráfico que ilustra los efectos de los vehículos de control, PD325901, interferón beta-1a pegilado, interferón beta-1a pegilado y PD325901 sobre el volumen del tumor SK-MEL-1 en ratones sin pelo inoculados con células de melanoma humano SK-MEL-1.

10

La figura 4 es una western blot que ilustra los efectos de los vehículos de control, PD325901, interferón beta-1a pegilado, interferón beta-1a pegilado y PD325901 en la fosforilación de ERK en los tumores SK-MEL-1.

15

La figura 5 es un gráfico que ilustra que el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de melanoma humano A-375 después del tratamiento con los vehículos de control, interferón-beta-1a pegilado en solitario, temozolomida en solitario, e interferón beta-1a pegilado en combinación con temozolomida.

La figura 6A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores humanos de carcinoma renal SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg de interferón beta-1a pegilado. La figura 6B es un gráfico que ilustra el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con vehículos de control, 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado.

20

La figura 7A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, bevacizumab en solitario, interferón-beta-1a pegilado en solitario y una combinación de bevacizumab e interferón beta-1a pegilado. La figura 7B es un gráfico que ilustra el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, bevacizumab en solitario, interferón beta-1a pegilado en solitario, y una combinación de bevacizumab e interferón beta-1a pegilado.

25

30

La figura 8A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, sorafenib en solitario, interferón beta 1a pegilado en solitario, y una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado, en una programación de dosificación simultánea. La figura 8B es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, sorafenib en solitario, interferón beta 1a pegilado en solitario, y una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado en una programación de dosificación secuencial.

35

La figura 9A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, temsirolimus en solitario, interferón-beta-1a pegilado en solitario, y una combinación de temsirolimus e interferón-beta-1a pegilado. La figura 9B es un gráfico que ilustra el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma renal humano SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, temsirolimus en solitario, interferón-beta-1a pegilado en solitario, y una combinación de temsirolimus e interferón-beta-1a pegilado.

40

45

La figura 10 es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de carcinoma de colon humano SW-620 después del tratamiento con el vehículo de control, e IFN-beta-1a pegilado en diferentes dosis.

La figura 11 es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de carcinoma de colon humano SW-620 después del tratamiento con los vehículos de control, avastina (bevacizumab) en solitario, irinotecán en solitario, interferón beta-1a pegilado en solitario, una combinación de avastina e interferón-beta-1a pegilado y una combinación de irinotecán e interferón beta-1a pegilado.

50

La figura 12 es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con los vehículos de control y paclitaxel.

55

La figura 13A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con los vehículos de control e IFN-beta-1a pegilado, en diferentes dosis. La figura

13B es un gráfico que ilustra el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con los vehículos de control e interferón beta-1a pegilado en diferentes dosis. La figura 13C es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-468 tratados con los vehículos de control, IFN-beta-1a, o IFN-beta-1a pegilado.

5

La figura 14A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, IFN-beta-1a pegilado en solitario, paclitaxel en solitario, y una combinación de IFN-beta-1a pegilado y paclitaxel. La figura 14B es un gráfico que ilustra el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, IFN-beta-1a pegilado en solitario, paclitaxel en solitario, y una combinación de IFN-beta-1a pegilado y paclitaxel. La dosis de interferón beta 1a pegilado usado en las figuras 14A y 14B fue de 0,8 mg/kg.

10

La figura 15A es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con el vehículo de control, IFN-beta-1a pegilado en solitario, paclitaxel en solitario, y una combinación de IFN-beta-1a pegilado y paclitaxel. La figura 15B es un gráfico que ilustra que el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, IFN-beta-1a pegilado en solitario, paclitaxel en solitario, y una combinación de IFN-beta-1a pegilado, y paclitaxel. La concentración de interferón beta 1a pegilado usada en las figuras 15A y 15B fue 1,6 mg/kg.

15

20 La figura 16 es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de melanoma humano WM-266-4 tratados con IFN-beta-1a pegilado a 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg y 0,8 mg/kg.

Las figuras 17A-17C son gráficos que ilustran el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de melanoma humano WM-266-4 tratados con el vehículo de control, 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg, o 1,6 mg/kg de interferón beta-1a pegilado una vez a la semana (QW), dos veces a la semana (BIW), o tres veces a la semana (TIW).

25

La figura 18 es un gráfico que ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores grandes de melanoma humano WM 266-4 tratados con IFN-beta-1a pegilado a 0,8 mg/kg y 1,6 mg/kg.

30 La figura 19A es una western blot que ilustra el efecto sobre la activación de la caspasa y la escisión de PARP en células de melanoma WM-266-4 tratadas con interferón-beta-1a pegilado durante 48 horas. Las figuras 19B-19C son gráficos que ilustran las veces de inducción de caspasa 3 y PARP respectivamente, en células de melanoma WM-266-4 tratadas con interferón-beta-1a pegilado durante 48 horas.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El interferón-beta se usa actualmente para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Por ejemplo, el interferón-beta-1a se comercializa en Estados Unidos con los nombres comerciales de AVONEX™ (Biogen Idec MA Inc.) y REBIF™ (EMD Serono) e interferón-beta-1b se comercializa en Estados Unidos como BETASERON™ (Berlex) y EXTAVIA™ (Novartis).

40

El término "interferón" o "IFN", como se usa en el presente documento, se refiere a la familia de proteínas específicas de especies altamente homologas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modulan las respuestas inmunes. Los interferones humanos se agrupan en dos clases; Tipo I, incluyendo interferón-alfa y beta, y Tipo II, que se representa por interferón gamma solamente. Las formas recombinantes de cada grupo se han desarrollado y están disponibles en el mercado. Los subtipos de cada grupo se basan en las características antigénicas/estructurales. Un ejemplo de interferón que se usa en el presente documento es un interferón-beta humano que se glicosila en el residuo 80 (Asn 80) y que se obtiene a través de tecnologías de ADN recombinante. Un ejemplo adicional de interferón usado en el presente documento es el Interferón beta-1a pegilado que está modificado en el grupo α -amino N-terminal con un único grupo mPEG-0-2-metilpropionaldehído lineal de 20 kDa.

50

Este interferón beta-glicosilado se conoce como "interferón-beta-1a" o "IFN-beta-1a" o "interferón beta 1a", todos se usan indistintamente. El término "interferón-beta-1a" también pretende incluir mutantes del mismo, siempre que dichos mutantes estén glicosilados también en el residuo 80 (Asn 80). Se conocen métodos de ADN recombinante para producir proteínas, incluyendo los interferones. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.399.216, 5.149.636, 5.179.017 (Axel y col.) y patente de Estados Unidos n.º 4.470.461 (Kaufman). Otro ejemplo de interferón que puede usarse es el interferón beta-1b. El interferón beta-1b puede producirse en la bacteria *E. coli* usando una secuencia de gen humano modificada que contiene una sustitución cisteína-serina desarrollada mediante ingeniería genética en la posición del aminoácido 17 y puede estar no glicosilada.

55

Pueden usarse mutantes de interferón-beta-1a. Las mutaciones se desarrollan usando métodos convencionales de mutagénesis dirigida, conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir polinucleótidos de interferón-beta-1a equivalentes funcionalmente que codifican los polipéptidos de interferón-beta-1a equivalentes funcionalmente.

5

También se contempla la construcción de plásmidos de ADN recombinante que contienen secuencias que codifican al menos parte del interferón de fibroblasto humano y la expresión de un polipéptido que tiene actividad inmunológica o biológica de interferón de fibroblasto humano. La construcción de genes híbridos de interferón beta que contienen combinaciones de secuencias de subtipo diferentes puede lograrse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

10

La proteína de interferón-beta puede conjugarse con residuos de polialquilenglicol de alquil polialquilenglicoles C1-C4, preferiblemente polietilenglicol (PEG) o residuos de poli(oxi)alquilenglicol de tales glicoles. Por lo tanto, el polímero al que la proteína se une puede ser un homopolímero de polietilenglicol (PEG) o es un poliol polioxiethylado, siempre que, en todos los casos, el polímero sea soluble en agua a temperatura ambiente. Los ejemplos no limitantes de dichos polímeros incluyen homopolímeros de óxido de polialquileo tales como PEG o polipropilenglicoles, glicoles polioxiethylados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad del agua del copolímero de bloque. Los ejemplos de polioles polioxiethylados incluyen, por ejemplo, glicerol polioxiethylado, sorbitol polioxiethylado, glucosa polioxiethylada, o similares. La estructura principal de glicerol del glicerol polioxiethylado es la misma estructura principal que se produce naturalmente en, por ejemplo, animales y seres humanos en mono, di y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no se verá necesariamente como un agente extraño en el cuerpo.

15

20

Como una alternativa a los óxidos de polialquileo, pueden usarse dextrano, polivinilpirrolidonas, poli(acrilamidas, alcoholes de polivinilo, polímeros basados en carbohidratos y similares. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior es simplemente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas en el presente documento. El polímero no necesita tener ningún peso molecular particular, pero se prefiere que el peso molecular esté entre aproximadamente 300 y 100.000, más preferiblemente entre 10.000 y 40.000. Particularmente, los tamaños de 20.000 o más son los mejores para prevenir la pérdida de proteína debido a la filtración en los riñones.

25

30

La derivación del polialquilenglicol tiene varias propiedades ventajosas en la formulación de los conjugados de polímero-interferón beta-1a, ya que se asocian a las siguientes propiedades de los derivados de polialquilenglicol: mejora de la solubilidad acuosa, mientras que al mismo tiempo provoca respuesta no antigénica o inmunogénica; altos grados de biocompatibilidad; ausencia de biodegradación *in vivo* de los derivados de polialquilenglicol; y facilidad de excreción por los organismos vivos. Un ejemplo de un interferón-beta-1a pegilado que puede usarse en las composiciones descritas en el presente documento puede incluir interferón-beta-1a modificado en el grupo α -amino N-terminal con un único grupo mPEG-0-2-metilpropionaldehído lineal de 20 kDa (véase Baker DP y col. 2006, Bioconjugate Chem. 17, 179-188). La conjugación de interferón beta con PEG que incluye mPEG-propionaldehído se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 7.446.173 y la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20050107277.

35

40

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas acuosas o en forma liofilizada. Una composición estable de interferón-beta presenta poco o ningún signo de uno o más de agregación, fragmentación, desamidación, oxidación, o cambio en la actividad biológica durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, 12 meses, 24 meses, 36 meses o más. Por ejemplo, en una realización, se agrega, fragmenta u oxida menos del 10 % de la composición. La agregación, precipitación y/o desnaturalización puede evaluarse por métodos conocidos, tales como examen visual del color y/o claridad, o mediante dispersión de luz UV o cromatografía de exclusión por tamaño. La capacidad de la proteína para conservar su actividad biológica puede evaluarse detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas de la proteína. La modificación del tamaño (por ejemplo, corte) puede evaluarse usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o desorción-ionización mediante láser asistida por matriz/espectrometría de masas tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), o mapeo peptídico de proteína tratada con endoproteínasa, por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como un resultado de la desamidación), que puede evaluarse por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico. Una proteína conserva su actividad biológica en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica de la proteína en un momento dado está dentro de aproximadamente el 10 % de la actividad biológica mostrada en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica según se determinó en un ensayo.

50

55

El interferón-beta o interferón-beta-1a o interferón-beta-1a pegilado, por ejemplo, pueden proporcionarse en una solución tamponada a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. El interferón-beta-1a puede proporcionarse en una solución tamponada a una concentración de 0,25 mg/ml. La composición puede almacenarse a 2-25 °C, 5 °C, a 10 °C, a 15 °C, a 20 °C o a 25 °C. La composición puede ser estable a temperatura ambiente durante 1, 2, 3, 4 o 5 días o más. La temperatura ambiente puede ser aproximadamente 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C o 25 °C. La composición puede almacenarse a una primera temperatura inferior, por ejemplo, menos de 18 °C, o de aproximadamente congelación pero a o por debajo de 15 °C, 10 °C o 4 °C y puede almacenarse a una segunda temperatura más alta por ejemplo, sin refrigeración o a temperatura ambiente, durante aproximadamente 1-5 días.

Las composiciones farmacéuticas son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Una composición farmacéutica también puede ensayarse para asegurar que cumple con los estándares reguladores y de la industria para su administración.

Las afecciones ejemplares que pueden tratarse con interferón incluyen, pero sin limitación, trastornos de proliferación celular, incluyendo cánceres, esclerosis múltiple e infecciones víricas. Sin limitación, el tratamiento con interferón puede usarse para tratar afecciones que pudieran beneficiarse de la inhibición de la replicación de virus sensibles al interferón. Un cáncer puede incluir un carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, glioma, carcinoma de mama, tumor carcinoide, cáncer cervical, carcinoma de colon, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer del conducto biliar extrahepático, tumor de Ewings, tumor de células germinales extracraneales, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células del islote, cáncer renal, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de la cavidad bucal y labios, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, mesotelioma, carcinoma de la célula de merkel, cáncer de cabeza y cuello escamoso metastásico, mieloma, neoplasia, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer bucal, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer nasal y del seno, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de feocromocitoma, cáncer de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de la glándula salivar, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, linfoma de linfocitos T, sarcoma del tejido blando, cáncer de estómago, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de la uretra, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva o tumor de Wilms.

El IFN-beta o IFN-beta pegilado puede administrarse en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar cualquiera de las afecciones que se han descrito anteriormente. La expresión "cantidad farmacológicamente eficaz" se refiere a la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que se busca por un investigador o médico. Es una cantidad que es suficiente para afectar significativamente a una respuesta clínica positiva, mientras que mantiene niveles disminuidos de efectos secundarios. La cantidad de IFN-beta pegilado, por ejemplo, que puede administrarse a un sujeto que necesita el mismo está en el intervalo de 0,01-1000 µg/kg, o más preferiblemente 0,01-100 µg/kg. El interferón-beta-1a o interferón-beta-1a pegilado pueden proporcionarse en una solución tamponada a un intervalo de concentración de 0,1-5 mg/ml, o más preferiblemente 0,25-1 mg/ml y puede administrarse en dosis individuales o divididas. El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, por ejemplo, un mamífero, humano o no humano. Los sujetos ejemplares incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, cobayas, ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, aves, ciervos, alces, conejos, renos, ciervos y caballos.

La administración de la dosificación descrita puede ser cada dos días, pero preferiblemente se produce una vez a la semana o cada dos semanas. Las dosis pueden administrarse durante al menos un periodo de 24 semanas mediante inyección. El régimen de dosificación utilizando la composición descrita en el presente documento se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto en particular o la sal del mismo empleados. La actividad del interferón-beta y la sensibilidad del paciente a los efectos secundarios también se consideran. Un médico o un veterinario experto puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz necesaria del fármaco para prevenir, contrarrestar, o detener el avance de la enfermedad.

Aún en otra realización, la composición es adecuada para la administración subcutánea o intramuscular. Incluso en otra realización, la composición es adecuada para administración IV. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por un modo parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intraperitoneal o

intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, administración subcutánea o intramuscular, así como inyección intravenosa, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, subcapsular, 5 subaracnoide, intraespinal, epidural, e intraesternal e infusión. La administración de la dosis puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular, o cualquier otro método sistémico aceptable. En base al criterio del médico del caso, la cantidad de fármaco administrado y el régimen de tratamiento usado dependerá, por supuesto, de la edad, sexo y la historia médica del paciente que se trata, el recuento de neutrófilos (por ejemplo, la gravedad de la neutropenia), la gravedad de la condición de la enfermedad específica y la tolerancia del paciente al tratamiento como se evidencia 10 por la toxicidad local y los efectos secundarios sistémicos.

La administración inyectable parental se usa generalmente por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa e infusiones. Por ejemplo, una inyección subcutánea puede usarse para suministrar un intervalo de 0,01-1000 µg/kg, o más preferiblemente 0,01-100 µg/kg. El interferón-beta-1a o interferón-beta-1a pegilado puede proporcionarse en 15 una solución tamponada a una concentración en el intervalo de 0,1-5 mg/ml, o más preferiblemente 0,25-1 mg/ml. Adicionalmente, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de un sistema de liberación sostenida o liberación lenta, que asegura que se mantenga un nivel constante de dosificación, de acuerdo con la Patente de Estados Unidos n.º 3.710.795.

20 Las composiciones liofilizadas para inyecciones pueden prepararse, por ejemplo, por disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar la solución o suspensión inyectable. Además, pueden formularse formas sólidas/liofilizadas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son preferiblemente soluciones o suspensiones acuosas isotónicas. Las composiciones 25 pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Adicionalmente, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos. Por ejemplo, las composiciones 30 farmacéuticas pueden administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin agujas, tales como los dispositivos desvelados en las patentes de Estados Unidos n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes bien conocidos y módulos incluyen: la patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que desvela una bomba de micro-infusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para 35 administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de la medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración osmótica del fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras, y la patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, 40 que desvela un sistema de administración osmótica del fármaco. La composición terapéutica también puede estar en forma de una formulación de liberación sostenida biodegradable o no biodegradable para administración subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.773.919 y 4.767.628 y la solicitud PCT n.º WO 94/15587. La administración continua también puede lograrse usando una bomba implantable o externa. La administración puede realizarse además de forma intermitente, por ejemplo, inyección diaria única, o en una forma 45 continua a una dosis baja, por ejemplo, formulación de liberación sostenida. El dispositivo de administración puede modificarse para adecuarse óptimamente a la administración de interferón-beta. Por ejemplo, una jeringa puede estar siliconizada en una medida que es óptima para el almacenamiento y administración de interferón-beta. Por supuesto, también se conocen muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos.

50 En otro aspecto, el IFN-beta o IFN-beta pegilado se administra en combinación con un segundo agente terapéutico en una cantidad farmacológicamente eficaz para tratar cualquiera de las afecciones que se han descrito anteriormente. Un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer en un sujeto, puede incluir identificar un sujeto diagnosticado con un cáncer. Identificar un sujeto diagnosticado con cáncer puede incluir auto-identificación, identificación mediante diagnóstico, identificación mediante remisión de un médico o identificación 55 mediante remisión de una organización. La identificación mediante diagnóstico puede incluir biopsias, pruebas de imagen, pruebas de laboratorio, pruebas genómicas o palpaciones. Una organización remitente puede ser una clínica, hospital, agencia o grupo de apoyo.

Inhibir la proliferación del cáncer puede incluir retardar la velocidad a la que las células cancerosas experimentan la

mitosis. Tratar el cáncer en un sujeto puede incluir inhibir la proliferación del cáncer y mejorar la condición médica general del sujeto.

El sujeto puede tratarse con interferón-beta-1a pegilado en solitario como una monoterapia o en combinación con otros fármacos adecuados como se describe en el presente documento, en función del tipo de cáncer. Los fármacos pueden administrarse de forma secuencial que puede estar en un orden predeterminado, o administrarse simultáneamente. Un método para tratar el cáncer en un sujeto puede incluir determinar un tiempo suficiente después de administrar el interferón-beta-1a pegilado en solitario o en combinación si un signo o síntoma de un cáncer en particular se inhibe para determinar si el cáncer es eficaz. Un método para inhibir la proliferación del cáncer en un sujeto puede incluir determinar un tiempo suficiente después de administrar el interferón-beta-1a pegilado en solitario o en combinación, si un signo o síntoma de un cáncer en particular se inhibe para determinar si el tratamiento es eficaz. Un tiempo suficiente puede ser al menos 1 día, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 5 años o más de 5 años después. El tiempo puede medirse a partir del momento en que se administra interferón pegilado beta-1a en solitario o en combinación con un segundo fármaco o un segundo fármaco.

Un signo o síntoma de cáncer puede incluir el tamaño del tumor. El tamaño del tumor puede medirse midiendo el diámetro menor del tumor, el diámetro mayor del tumor, o calculando el volumen del tumor. El tamaño del tumor puede determinarse por palpación, rayos X, escáner de tomografía computarizada, imagen por resonancia magnética, tomografía de emisión por positrones o escáner óseo, entre otros.

Un cambio celular pueden ser un signo o síntoma de un cáncer. Los cambios celulares pueden determinarse tomando una biopsia del tumor y usando técnicas histológicas para examinarlo. Un cambio celular puede incluir una velocidad aumentada de la proliferación celular, una velocidad disminuida de la muerte celular o una necesidad disminuida de adhesión. Un signo o síntoma puede incluir la expresión alterada de proteína. Esto puede incluir la regulación defectuosa o irregularidad de la expresión de una proteína. La expresión alterada de proteína, puede incluir la expresión baja, sobreexpresión o un cambio en la modificación postraducciona. La expresión alterada de la proteína puede incluir una presencia de la proteína en una región donde la proteína no está presente normalmente, o una ausencia de la proteína en una región donde la proteína está presente normalmente. La expresión alterada de la proteína, puede incluir además cambios en la sincronización relacionada con la proteína. Por ejemplo, la proteína está presente en una fase de desarrollo, ciclo celular o transducción de señal en la que normalmente no está presente o está ausente cuando está normalmente presente. La expresión alterada de la proteína puede dar como resultado la actividad de una proteína que se modifica. La proteína puede ser más activa o menos activa. Una actividad puede estar ausente, se puede desarrollar una nueva actividad o puede cambiar la especificidad de una actividad. La proteína puede activarse o inactivarse también en un momento incorrecto en una fase de desarrollo, ciclo celular o transducción de señal.

Un signo o síntoma de cáncer puede incluir atributos de la piel, que incluyen atributos de un lunar, mancha, peca, llaga, bulto, marca o llaga. Los atributos pueden incluir la forma, color o tamaño del lunar, mancha, peca, bulto, marca o llaga. La forma puede ser asimétrica, irregular, desigual, mellada o borrosa. El color puede ser desigual e incluir negro, marrón, rojo, rosa, azul o blanco. El tamaño puede ser mayor de 4 milímetros, mayor de 5 milímetros o mayor de 6 milímetros. El número de lunares, manchas, pecas, bultos, marcas o llagas puede ser además un signo o síntoma de melanoma. La duración del lunar, mancha, peca, bulto, marca o llaga que ha estado presente puede ser un signo o síntoma de melanoma. Otro signo o síntoma puede ser un lunar, mancha, peca, bulto, marca o llaga que no se cura o que aumenta de tamaño y gravedad. Los cambios en la sensación de la piel, por ejemplo, sensibilidad, comezón o dolor, pueden ser un signo o síntoma de melanoma. Adicionalmente, los cambios en la superficie del lunar, mancha, peca, bulto, marca o llaga pueden ser un signo o síntoma. Por ejemplo, el cambio puede incluir descamación, exudación, sangrado u otro cambio de aspecto.

Inhibido puede significar que el signo o síntoma se disminuye o el número de signos o síntomas se disminuye. Una disminución en el número de signos o síntomas puede incluir el número total de apariciones de diferentes signos o síntomas o el número total de apariciones del mismo signo o síntoma. Por ejemplo, el volumen del tumor puede disminuir o podría reducir el número de tumores. Otro ejemplo puede incluir el signo de una proteína expresada a la baja. Una disminución en este signo podría ser un aumento en la expresión. De manera similar, una disminución en el signo que incluye la pérdida de actividad de la proteína podría ser un aumento en la actividad de la proteína.

Melanoma

Un cáncer puede incluir el melanoma. El melanoma puede ser un melanoma de extensión superficial, un melanoma

nodular, un melanoma maligno lentigo o un melanoma acral lentiginoso. El melanoma puede incluir un mutante BRAF. El mutante BRAF puede ser un mutante BRAF V600E.

Un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer que puede incluir el melanoma en un sujeto, puede incluir administrar un inhibidor de una proteína cinasa en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. La proteína cinasa puede estar en la ruta Ras-Raf-MEK-ERK. El inhibidor de una proteína cinasa en la ruta Ras-Raf-MEK-ERK puede ser un inhibidor de EGFR, Ras, B-Raf, MEK o ERK. El inhibidor puede ser cetuximab, erlotinib, trastuzumab, imatinib u oblimersen. El inhibidor puede ser un inhibidor de la farnesiltransferasa o un ácido farnesiltiosalicílico. El inhibidor puede ser además GW5074 (Glaxo Wellcome, Inc.), BAY 43-9006 (Bayer AG), Ro 09-2210 (Roche Products Limited), L-783277 (Merck), PD 169316 (Calbiochem), SB 203580 (Calbiochem), U 0126 (Calbiochem), PD 98059 (Calbiochem), PD 184352 (United States Biological), PD 0325901 o AZD 8330 (AstraZeneca), FR180204 (Calbiochem) o calpeptina. El inhibidor puede ser una N-[(2R)-2,3-dihidroxipropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodo-fenil)amino]benzamida (PD 0325901).

La dosis del inhibidor de una proteína cinasa administrada a un sujeto puede ser menor de 10 µg, menor de 25 µg, menor de 50 µg, menor de 75 µg, menor de 0,10 mg, menor de 0,25 mg, menor de 0,5 mg, menor de 1 mg, menor de 2,5 mg, menor de 5 mg, menor de 10 mg, menor de 15 mg, menor de 20 mg, menor de 50 mg, menor de 75 mg, menor de 100 mg, menor de 200 mg, menor de 300 mg, menor de 400 mg, menor de 500 mg, menor de 750 mg, menor de 1 g, menor de 2 g o menor de 5 g.

En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer que puede incluir el melanoma en un sujeto, puede incluir administrar un agente de ADN alquilante o metilante en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. Un agente alquilante puede ser un agente que una un grupo alquilo (C_nH_{2n+1}) al ADN. El grupo alquilo se une a la base guanina de ADN, en el átomo de nitrógeno número 7 del anillo de imidazol. El agente alquilante puede incluir 4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida (temozolomida, también conocido como TEMODAR®).

La dosis de un agente ADN alquilante o metilante, por ejemplo, la temozolomida administrada a un sujeto puede estar entre 50 mg/m² a 200 mg/m². La temozolomida puede administrarse a un sujeto a una dosis de aproximadamente 50 mg/m², 75 mg/m², 90 mg/m², 100 mg/m², 135 mg/m², 175 mg/m², 200 mg/m² o más durante un período de tiempo. La temozolomida puede administrarse una vez al día durante 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días o 50 días o más. La temozolomida puede administrarse en forma de comprimido o a través de inyección. La temozolomida puede administrarse en un ciclo de 28 días durante un ciclo, 2 ciclos, 3 ciclos, 4 ciclos, 5 ciclos, 6 ciclos o más según sea necesario. La temozolomida puede administrarse por vía intravenosa durante 60 minutos o menos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos o más. La temozolomida puede administrarse durante una fase de mantenimiento adicional después del ciclo inicial de tratamiento. Otras dosis adecuadas y la duración de la administración de temozolomida para su uso en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado pueden determinarse por métodos conocidos por un experto en la técnica.

40 Carcinoma de células renales

Un cáncer puede incluir un carcinoma de células renales. El carcinoma de células renales (también conocido como adenocarcinoma renal o hipernefomas) es un tipo de cáncer de riñón en el que las células cancerosas se encuentran en el revestimiento de tubos muy pequeños (túbulos) en el riñón. El carcinoma de células renales puede incluir el carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células renales papilar, carcinoma de células renales cromófono, carcinoma de células renales del tubo colector, y carcinoma de células renales no clasificado.

En un aspecto adicional, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer tal como el carcinoma de células renales en un sujeto, puede incluir administrar IFN-beta pegilado a un sujeto. En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer tal como el carcinoma de células renales en un sujeto, puede incluir administrar un anticuerpo anti-VEGF en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado tal como bevacizumab (Avastin™, Genentech/Roche).

La dosis de un anticuerpo anti-VEGF administrado a un sujeto puede estar entre 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. Por ejemplo, bevacizumab puede administrarse por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 12,5 mg/kg o 15 mg/kg durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo puede incluir cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada mes. Otras dosis adecuadas y la duración de la administración de bevacizumab para su uso en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado pueden determinarse mediante

métodos conocidos por un experto en la técnica.

En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer tal como el carcinoma de células renales en un sujeto, puede incluir administrar una diana mamífera del inhibidor de rapamicina (mTOR) en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. Los inhibidores de mTOR pueden incluir temsirolimus (Torisel™, Wyeth).

La dosis de un inhibidor de mTOR, por ejemplo temsirolimus administrado a un sujeto, puede estar entre 10 mg a 60 mg, 15 mg a 55 mg, 20 mg a 50 mg, 25 mg a 45 mg. El temsirolimus puede administrarse a un sujeto a una dosis de 25 mg infundido durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo puede ser 10-120 minutos o 30-60 minutos una vez a la semana o varias veces a la semana, una vez cada dos semanas o varias veces cada dos semanas, o una vez al mes o varias veces en un mes. Otras dosis adecuadas y la duración de la administración de temsirolimus para su uso en combinación con IFN-beta o interferón-beta pegilado pueden determinarse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer, tal como el carcinoma de células renales en un sujeto, puede incluir administrar un inhibidor de serina/treonina o tirosina proteína cinasa en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. Un inhibidor de serina/treonina o tirosina proteína cinasa puede incluir inhibidores de la ruta Ras/Raf/Mek/Erk, tal como un inhibidor de Raf-1. Un inhibidor de Raf-1 puede incluir 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida (sorafenib, conocido además como NEXAVAR®).

La dosis de un inhibidor de Raf-1, por ejemplo, sorafenib administrado a un sujeto, puede estar entre 200-800 mg. Sorafenib puede tomarse en forma de comprimidos a una dosis de 200 mg, 400 mg, o 800 mg una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, o cuatro veces al día. Otras dosis adecuadas y la duración de la administración de sorafenib para su uso en combinación con IFN-beta o interferón-beta pegilado pueden determinarse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

Carcinoma de colon

Un cáncer puede incluir carcinoma de colon que es un cáncer del intestino grueso. El cáncer de colon puede comenzar como grupos de células pequeñas, no cancerosas (benignas) llamadas pólipos adenomatosos que pueden desarrollarse en cáncer de colon. El cáncer rectal es el cáncer de las varias últimas pulgadas del colon y, con frecuencia, puede desarrollarse junto con el cáncer de colon (también conocido como cáncer colorrectal).

En un aspecto adicional, un método para inhibir la proliferación de cáncer, o tratar el cáncer, tal como carcinoma de colon en un sujeto, puede incluir administrar el IFN-beta pegilado a un sujeto. En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer tal como carcinoma de colon en un sujeto, puede incluir administrar el anticuerpo anti-VEGF en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, o fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado, tal como bevacizumab (Avastin™, Genentech/Roche).

Carcinoma de mama

El cáncer de mama es un cáncer que comienza en los tejidos de la mama y puede incluir el carcinoma ductal y carcinoma lobular. En casos poco comunes, el cáncer de mama puede comenzar en otras áreas de la mama. El cáncer de mama puede ser sensible a los estrógenos. El cáncer de mama puede ser positivo a HER2. Los tratamientos actuales para el cáncer de mama incluyen tamoxifeno, que bloquea los efectos del estrógeno, o terapia dirigida que incluye herceptina.

En un aspecto adicional, un método para inhibir la proliferación del cáncer, o tratar el cáncer, tal como carcinoma de mama, en un sujeto, puede incluir administrar IFN-beta pegilado a un sujeto. En otro aspecto, un método para inhibir la proliferación del cáncer o tratar el cáncer, tal como carcinoma de mama, en un sujeto, puede incluir administrar un inhibidor mitótico en combinación con IFN-beta o IFN-beta pegilado a un sujeto. Un inhibidor mitótico puede incluir taxol (paclitaxel).

Las dosis de paclitaxel administradas a un sujeto pueden estar entre 5 mg/m² a 200 mg/m². El paclitaxel puede administrarse por vía intravenosa a un sujeto a una dosis de aproximadamente 50 mg/m², 90 mg/m², 100 mg/m², 135 mg/m² o 175 mg/m² durante un periodo de tiempo. El paclitaxel puede administrarse durante 1 hora, 2 horas,

3 horas, 4 horas, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas o 24 horas o más cada 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, mes o más. Otras dosis adecuadas y la duración de la administración de paclitaxel para su uso en combinación con IFN- beta o IFN-beta pegilado pueden determinarse por métodos conocidos por un experto en la técnica.

5 EJEMPLO 1

Efecto antiangiogénico del interferón beta 1a pegilado

Ratones sin pelo atímicos se inocularon con 2×10^6 células de melanoma humano SK-MEL-1 (1 inyección por costado, 1 inyección por ratón) y se establecieron tumores (100-200 mm cúbicos). En un estudio de dosis única, los grupos de 4 ratones que tenían tumores de melanoma humano SK-MEL-1 recibieron una vez en el día 1 lo siguiente: vehículo de control, 5 µg (1 MU) de IFN-beta-1a o 10 µg (1 MU) de IFN-beta-1a pegilado. El interferón beta-1a pegilado, como se usa a lo largo de los ejemplos descritos en el presente documento, se modifica en el grupo α -amino N-terminal con un único grupo mPEG-O-2-metilpropionaldehído, lineal de 20 kDa. En un estudio de dosis múltiple, los grupos de 3 ratones que tenían tumores de melanoma humano SK-MEL-1 recibieron lo siguiente: vehículo de control una vez solo en el día 1, 10 µg (1 MU) de IFN-beta-1a pegilado una vez en el día 1 únicamente, vehículo de control los días 1-9 o 5 µg (1 MU) de IFN-beta-1a los días 1-9. Después, los ratones se sacrificaron el día 10 y se contó el número de vasos que entran en la periferia del tumor. El evaluador de la neovascularización era ciego en cuanto a los grupos de tratamiento.

Resultados: La semivida de IFN-beta-1a pegilado en los ratones sin pelo es aproximadamente de 10 horas. La figura 1 ilustra los efectos del control, IFN-beta-1a, e IFN-beta-1a pegilado en la formación del tumor inducido por vasos sanguíneos de los ratones sin pelo inoculados con células de melanoma humano SK-MEL-1. El IFN-beta-1a pegilado fue significativamente más eficaz en la reducción de la formación del tumor inducido por vasos sanguíneos. Además, el IFN-beta-1a pegilado dado o una vez en el día 1 fue más eficaz que IFN-beta-1a dado una vez en el día 1. Véase la figura 1A. IFN-beta-1a pegilado dado una vez en el día 1 fue comparable (ligera superior) con IFN-beta-1a dado diariamente en los días 1-9. Véase la Figura 1B. Es poco probable que la proteína humana actúe sobre células murinas del vaso ya que IFN-beta-1a humano no se activa en las células murinas (L929) a concentraciones 10 veces mayores que las requeridas para la actividad total de IFN-beta murino (es decir, se requiere especificidad de especie). Es más probable que el IFN-beta-1a pegilado que actúe sobre el propio tumor ya sea inhibiendo específicamente la producción de factores pro-angiogénicos o inhibiendo el crecimiento del tumor, e inhibiendo indirectamente así la producción de factores pro-angiogénicos.

Efecto antiangiogénico del inhibidor de MEK PD325901

Ratones sin pelo atímicos se inocularon con 2×10^6 células de melanoma humano SK-MEL-1 (1 inyección por costado; 2 inyecciones por ratón) y se establecieron tumores de 100-200 mm cúbicos. Los ratones (5 por grupo) se asignaron aleatoriamente y se trataron con 0, 1, 5, 10 y 20 mg/kg de PD 325901 en PEG400 PO (por vía oral) una vez al día (QD) durante 14 días. Los tumores se midieron cada 3 días usando calibradores y se calculó el volumen para un esferoide alargado definido como:

$$V = (\pi * L * W^2) / 6$$

donde L equivale al diámetro mayor y W equivale al diámetro menor.

Resultados: La figura 2 ilustra los efectos de diferentes dosis de PD 325901 en el volumen de tumor de SK-MEL-1 en ratones sin pelo inoculados con células de melanoma humano SK-MEL-1. A partir de este experimento, la dosis de 15 mg/kg de PD 325901 se seleccionó como una dosis sub-óptima.

Eficacia de la combinación de interferón-beta-1a pegilado e inhibidor de la cinasa MEK PD325901 en ratones sin pelo que portan tumores de melanoma humano SK-MEL-1

Ratones sin pelo atímicos se inocularon con 2×10^6 células de melanoma humano SK-MEL-1 (1 inyección en el costado; 1 inyección por ratón) y se establecieron tumores de 100-200 mm cúbicos. Se proporcionó IFN β -1a pegilado en ácido acético 20 mM/acetato sódico a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl que contenía 15 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA). Se usó HSA como un control y se administró a una concentración de 15 mg/ml. Los ratones (10 por grupo) se asignaron aleatoriamente y se trataron con:

i. PEG400 (una vez al día (QD) durante 14 días) e interferón-beta-1a pegilado (10 µg una vez a la semana (QW))

durante 3 semanas);

ii. PD325901 (15 mg/kg una vez al día (QD) durante 14 días) e interferón-beta-1a pegilado (10 µg una vez a la semana (QW) durante 3 semanas);

iii. PEG400 (una vez al día (QD) durante 14 días) y (HSA) (QW durante 3 semanas);

5 iv. PD325901 (15 mg/kg una vez al día (QD) durante 14 días) y HSA (QW durante 3 semanas).

Los tumores se midieron cada 3 días usando calibradores y se calculó el volumen para un esferoide alargado. La identidad del vehículo de control para el vehículo de interferón-beta-1a pegilado (HSA) e interferón-beta-1a pegilado fue ciega. Los tumores se extirparon 8 horas después de la última dosis y se congelaron para el análisis de fosforilación de ERK.

Resultados: La figura 3 ilustra los efectos de los vehículos de control, PD325901, interferón-beta-1a pegilado, interferón-beta-1a pegilado y PD325901 sobre el volumen de tumor de SK-MEL-1 en ratones sin pelo inoculados con células de melanoma humano SK-MEL-1. La figura 3 ilustra una diferencia significativa entre todos grupos de tratamiento y el grupo de vehículo de control. La figura 3 muestra también una diferencia significativa entre el volumen tumoral de los ratones tratados tanto con interferón-beta-1a pegilado como PD325901, en comparación con cualquier agente individual. La diferencia entre las estimaciones de los promedios de mínimos cuadrados entre los grupos de tratamiento y el grupo de vehículo de control sugiere un efecto aditivo de interferón-beta-1a pegilado y PD325901: PD325901 (-4,52), interferón-beta-1a pegilado (-4,77) e interferón-beta-1a pegilado y PD325901 (-8,63). Los grupos tratados con PD325901, e interferón-beta-1a pegilado y PD325901 mostraron inhibición significativa de la fosforilación de ERK en comparación con los grupos tratados con vehículo e interferón-beta-1a pegilado. Véase la figura 4.

Eficacia del interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con Temozolomida en ratones sin pelo que portan tumores de melanoma humanos A-375

Ratones sin pelo de 8-10 semanas de edad de Charles River Lab se inocularon por vía subcutánea con 2×10^6 células de melanoma humano A375 con matrigel al 50 % en la región del costado. Cuando los volúmenes tumorales medios alcanzaron aproximadamente 200 mm^3 , los ratones con tumor se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. El IFN β -1a pegilado se proporcionó en ácido acético 20 mM/acetato de sodio a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl (tampón 4,8 A). Se usó ácido acético 20 mM/acetato de sodio a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl (tampón 4,8 A) como un vehículo de control. La Temozolomida se proporcionó en una solución de tampón al 0,2 % de hidroxilpropilmetil celulosa (HPMC). El tampón de HPMC se usó como un vehículo de control.

Los ratones (7-9 por grupo) se asignaron aleatoriamente y se trataron como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Diseño de estudio para investigar la eficacia de Interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con Temozolomida en ratones sin pelo que tienen tumores de melanoma humano A-375.

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel (1:1)	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/volumen	N
1	Vehículo PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	0	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
2	Vehículo TMZ	2×10^6 células/0,2 ml	+	5	P.O, QD x 5 días	HPMC al 0,2 %/0,1 ml,	10
3	PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	0,1	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
4	PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	0,2	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
5	PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	0,4	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
6	PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	0,8	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml,	10
7	PEG-IFN beta-1a	2×10^6 células/0,2 ml	+	1,6	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml,	10
8	TMZ	2×10^6 células/0,2 ml	+	++ 5	P.O, QD x 5 días	HPMC al 0,2 %/0,1 ml,	10

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel (1:1)	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/volumen	N
9	TMZ/PEG-IFN beta-1a	2 x 10E6 células/0,2 ml	+	5/0,4	P.O, QD x 5 días/ S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/HPMC al 0,2 %	10

Resultados: La figura 5 ilustra el volumen tumoral en los ratones sin pelo de los tumores de melanoma humano A-375 después del tratamiento con los vehículos de control, interferón-beta-1a pegilado en solitario, Temozolomida en solitario, e interferón-beta-1a pegilado en combinación con Temozolomida. Como se observó, los ratones tratados con la combinación de interferón-beta-1a pegilado y Temozolomida demostraron una mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con el agente en solitario o con el vehículo en solitario.

Las curvas de crecimiento tumoral para los ratones tratados con 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 o 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado revelaron que la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones aumenta con el aumento de la dosificación (datos no mostrados). Sin embargo, la inhibición del crecimiento tumoral casi es similar en los ratones tratados con 0,4 o 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado (datos no mostrados). Además, los ratones tratados con 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado demostraron incluso una mayor inhibición del crecimiento tumoral que los ratones tratados con 0,4 o 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado (datos no mostrados).

15 EJEMPLO 2

Eficacia del interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con Sorafenib, Bevacizumab o Temeirolimus en ratones SCID que tienen tumores de carcinoma renal SN12C.

20 Ratones SCID de 8-10 semanas de edad de Charles River Lab se inocularon por vía subcutánea con 2×10^6 células de carcinoma renal SN12C con matrigel al 50 % en la región del costado. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente 250 mm^3 , los ratones con tumor se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. El IFN β -1a pegilado se proporcionó en ácido acético 20 mM/acetato sódico a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl (tampón 4,8 A). Se proporcionó Sorafenib en una mezcla de solución salina de etanol y cremophor (tampón CES). Se proporcionó Bevacizumab en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se proporcionó Temeirolimus en tampón que contenía NaCl al 0,9 %.

Los ratones (9-10 por grupo) se asignaron aleatoriamente y se trataron como se resume en la Tabla 2.

30 Tabla 2: Diseño de estudio para investigar la eficacia de Interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con Sorafenib, Bevacizumab y Temeirolimus en ratones SCID que tienen tumores de carcinoma renal SN12C.

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/Volumen	N
1	Vehículo para PEG-IFN beta-1a	2 x 10E6 células en Matrigel	0	SC, BIWx7	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)	10
2	Vehículo Combinado para Sorafenib y PEG-IFN beta-1a	2 x 10E6 células en Matrigel	0	PO, QDx14/SC, BIWx7	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)/CES (0,1 ml)	10
3	Bevacizumab	2 x 10E6 células en Matrigel	4	IP, BIWx7	PBS (0,2 ml)	10
4	Sorafenib	2 x 10E6 células en Matrigel	60	PO, QDx14	CES (0,2 ml)	10
5	Temeirolimus	2 x 10E6 células en Matrigel	50	IP, Q7Dx2	NaCl al 0,9 % (0,2 ml)	10
6	Temeirolimus	2 x 10E6 células en Matrigel	100	IP, Q7Dx2	NaCl al 0,9 % (0,2 ml)	10
7	PEG-IFN beta-1a	2 x 10E6 células en Matrigel	0,8	SC, BIWx7	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)	10

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/Volumen	N
8	PEG-IFN beta-1a	2 x 10E6 células en Matrigel	1,6	SC, BIWx7	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)	10
9	PEG-IFN beta-1a/Bevacizumab	2 x 10E6 células en Matrigel	0,8/4	SC, BIWx7/IP, BIWx7	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)/PBS (0,1 ml)	10
10	PEG-IFN beta-1a/Sorafenib	2 x 10E6 células en Matrigel	0,8/60	SC, BIWx7/PO, QDx14	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)/CES (0,1 ml)	10
11	PEG-IFN beta-1a/Sorafenib	2 x 10E6 células en Matrigel	0,8/60	SC, BIWx7/PO, QDx14 Primero Sorafenib seguido de PEG-IFN beta-1a	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)/CES (0,1 ml)	10
12	PEG-IFN beta-1a/Temsirolimus	2 x 10E6 células en Matrigel	0,8/50	SC, BIWx7/IP, Q7Dx2	Tampón acetato-arginina (4,8 A) (0,1 ml)/NaCl al 0,9 % (0,2 ml)	10

- Resultados:** La figura 6A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado. La figura 6B ilustra el % de T/C en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado. Como se observó, los ratones tratados con interferón-beta-1a pegilado demostraron la inhibición del crecimiento tumoral. Esto se confirma por las mediciones repetidas ANOVA seguido por los resultados del análisis estadístico de la prueba de salida de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran valores p de $p < 0,05$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado (a 0,8 mg/kg) frente a los ratones tratados con vehículo y $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado (a 1,6 mg/kg) frente a los ratones tratados con vehículo. El interferón beta 1a pegilado mostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa de una manera dependiente de la dosis al dosificarse a 0,8 mg/kg y 1,6 mg/kg en comparación con su vehículo.
- 15 La figura 7A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con los vehículos de control, 4 mg/kg de bevacizumab en solitario, 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y una combinación de bevacizumab e interferón-beta-1a pegilado. La figura 7B ilustra el % de T/C en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, bevacizumab en solitario a 4 mg/kg, 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y una combinación de bevacizumab e interferón-beta-1a pegilado. Como se observó, los ratones tratados con una combinación de 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y 4 mg/kg de bevacizumab demostraron una inhibición mayor del crecimiento tumoral. Esto se confirma por las mediciones repetidas ANOVA seguido por los resultados del análisis estadístico de la prueba de salida de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran valores p de $p < 0,01$ para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y bevacizumab frente a los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado, $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y bevacizumab frente a los ratones tratados con bevacizumab, y $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y bevacizumab frente a los ratones tratados con vehículo de control. El interferón beta 1a pegilado a 0,8 mg/kg dosificado en combinación con 4 mg/kg bevacizumab mostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con cualquier agente en solitario.
- 30 La figura 8A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, sorafenib a 60 mg/kg, interferón beta 1a pegilado a 0,8 mg/kg y una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado en una programación de dosificación simultánea. Como se observó, los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado demostraron una inhibición mayor del crecimiento de tumor. Esto se confirma mediante las mediciones repetidas ANOVA seguido de los resultados del análisis estadístico de la prueba de salida de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran los valores p de $p < 0,05$ para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado contra interferón beta 1a pegilado en solitario, $p < 0,01$ para la inhibición del crecimiento

tumoral en los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado contra sorafenib en solitario, $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado contra el vehículo en solitario. La dosificación simultánea de sorafenib con interferón beta 1a pegilado fue significativamente superior en el tratamiento con agentes únicos.

5

La figura 8B ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, sorafenib en solitario, interferón beta 1a pegilado en solitario, y una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado en una programación de dosificación secuencial. Como se observó, los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado demostraron una inhibición mayor del crecimiento de tumor. Esto se confirma mediante las mediciones repetidas ANOVA seguido de los resultados del análisis estadístico de la prueba de salida de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran valores p de $p < 0,01$ para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado contra sorafenib en solitario, y $p < 0,001$ de la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con una combinación de sorafenib e interferón beta 1a pegilado contra el vehículo en solitario. La dosificación secuencial de interferón beta 1a pegilado seguido por sorafenib fue estadísticamente superior al tratamiento con sorafenib en solitario pero no diferente de interferón beta 1a pegilado en solitario.

La figura 9A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, 50 mg/kg de temsirolimus en solitario, 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado en solitario, y una combinación de temsirolimus e interferón-beta-1a pegilado. La figura 9B ilustra el % de T/C en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano renal SN12C después del tratamiento con vehículos de control, temsirolimus en solitario a 50 mg/kg, 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y una combinación de temsirolimus e interferón-beta-1a pegilado. Como se observó, los ratones tratados con una combinación de 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y 50 mg/kg de temsirolimus demostraron una inhibición mayor del crecimiento de tumor. Esto se confirma mediante las mediciones repetidas ANOVA seguido de los resultados del análisis estadístico de la prueba de salida de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran valores p de $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado- y temsirolimus frente a los ratones tratados con vehículo de control, $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y temsirolimus frente a los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado, $p < 0,001$ para la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y temsirolimus contra ratones tratados con temsirolimus. Los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado (0,8 mg/kg) en combinación con temsirolimus mostraron una inhibición del crecimiento tumoral significativamente superior al compararse con los ratones tratados con los agentes únicos.

35 EJEMPLO 3

Eficacia del interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con Avastina (Bevacizumab) o Irinotecán en ratones sin pelo que tienen tumores de carcinoma humano SW-620.

40 Ratones sin pelo de 8-10 semanas de edad de Charles River Lab se inocularon por vía subcutánea con 1×10^6 células de carcinoma de colon SW620 con matrigel al 50 % en la región del costado. Cuando el volumen promedio de los tumores alcanzó aproximadamente 200 mm^3 , los ratones con tumor se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. El IFN β -1a pegilado se proporcionó en ácido acético 20 mM/acetato de sodio a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl (tampón 4,8 A). Los ratones se asignaron aleatoriamente y se trataron como se resume en la Tabla 3.

45

Tabla 3: Diseño de estudio para investigar la eficacia de Interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con paclitaxel en ratones sin pelo que tienen tumores de carcinoma de colon humano SW620.

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel (1:1)	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/volumen	N
1	Vehículo PEG-IFN-beta-1a	1×10^6 células/0,2 ml	+	0	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
2	Vehículo Irinotecán			0	I.P., QD x 10 días	Solución salina/0,1 ml	10

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel (1:1)	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo/volumen	N
3	Vehículo Combinado			0/0	S.C, BIW x 4 semanas/I.P., QD x 10 días	tampón 4,8 A/0,1 ml/ Solución salina/0,1 ml	10
4	Bevacizumab			4	I.P.,BIWx4	PBS/0,2 ml	10
5	PEG-IFN-beta-1a			0,4	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
6	PEG-IFN-beta-1a			0,8	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
7	PEG-IFN-beta-1a			1,6	S.C, BIW x 4 semanas	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
8	Irinotecán			10	I.P., QD x 10 días	Solución salina/0,1 ml	10
9	Irinotecán/PEG-IFN-beta-1a			10/0,8	I.P, QD x 10 días/S.C, BIW x 4 semanas	Solución salina 0,1 ml/tampón 4,8 A 0,1 ml	10
10	Bevacizumab/PEG-IFN-beta-1a			4/0,8	I.P., BIWx4/ S.C, BIW x 4 semanas	PBS 0,1 ml/tampón 4,8 A 0,1 ml	10

Resultados: La figura 10 ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de carcinoma humano SW-620 después del tratamiento con el vehículo de control (tampón 4,8 A), e IFN-beta-1a pegilado a concentraciones de 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg y 1,6 mg/kg. Los ratones se inyectaron por vía subcutánea dos veces a la semana (BIW) por 4 semanas. Como se observó, la inhibición del crecimiento del tumor es dependiente de la dosis. La figura 11 ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de carcinoma humano SW-620 después del tratamiento con los vehículos de control, avastina (bevacizumab) en solitario, irinotecán en solitario, interferón-beta-1a pegilado en solitario, una combinación de avastina e interferón-beta-1a pegilado, y una combinación de irinotecán e interferón-beta-1a pegilado. Como se observó, los ratones tratados con una combinación de 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y 4 mg/kg de Avastina demostraron una inhibición mayor del crecimiento del tumor en comparación con los ratones tratados con el agente en solitario. Por el contrario, los ratones tratados con una combinación de 0,8 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado y 10 mg/kg de irinotecán demostraron la misma inhibición del crecimiento de tumor que los ratones tratados con irinotecán en solitario.

15 EJEMPLO 4

Eficacia de interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con paclitaxel en ratones SCID que tienen tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231.

20 Ratones SCID de 8-10 semanas de edad de Charles River Lab se inocularon por vía subcutánea con 5×10^6 células de carcinoma de mama MDA-MB-231 con matrigel al 50 % en la región del costado. Cuando el volumen promedio de los tumores alcanzó aproximadamente 200 mm^3 , los ratones con tumor se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. El IFN β -1a pegilado se proporcionó en ácido acético 20 mM/acetato de sodio a un pH de 4,8 y arginina 150 mM/HCl (tampón 4,8 A). El Paclitaxel se proporcionó en una mezcla de solución salina de etanol y cremophor 25 (tampón CES).

Los ratones (10 por grupo) se asignaron aleatoriamente y se trataron como se resume en la Tabla 4.

30 Tabla 4: Diseño de estudio para investigar la eficacia de Interferón-beta-1a pegilado en solitario y en combinación con paclitaxel en ratones SCID que tienen tumores de carcinoma de mama humano MDA-MB-231.

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo	N
1	Vehículo para PEG-IFN beta-1a	$5 \times 10^6/0,2 \text{ ml}$	50%	0	S.C., BIW	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
2	Vehículo para Paclitaxel	$5 \times 10^6/0,2 \text{ ml}$	50%	0	I.P., q4dx3	Cremophor/Etanol	10

	Compuesto	Condiciones de inoculación	Matrigel	Dosis (mg/kg)	Rx (ruta, programación)	Vehículo	N
3	Vehículo Combinado para PEG-IFN beta-1a y Paclitaxel	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	0/0	S.C., BIW/I.P., q4dx3	tampón 4,8 A/0,1 ml/Cre mophor/Etanol	10
4	Paclitaxel	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	25	I.P., q4dx3	Cre mophor/Etanol	10
5	PEG-IFN beta-1a	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	0,4	SC, BIW	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
6	PEG-IFN beta-1a	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	0,8	SC, BIW	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
7	PEG-IFN beta-1a	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	1,6	SC, BIW	tampón 4,8 A/0,1 ml	10
8	BIIB017/Paclitaxel	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	0,8/25	SC, BIW/I.P., q4dx3	tampón 4,8 A/0,1 ml/Cre mophor/Etanol	10
9	BIIB017/Paclitaxel	5 x 10 ⁶ /0,2 ml	50%	1,6/25	SC, BIW/I.P., q4dx3	tampón 4,8 A/0,1 ml/Cre mophor/Etanol	10

Resultados: La figura 12 ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículos de control y paclitaxel. Como se observó, los ratones tratados con paclitaxel demostraron una inhibición mayor del crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con los vehículos de control. La figura 13A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículos de control e IFN-beta-1a pegilado a dosis de 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg y 1,6 mg/kg. La figura 13B resume el % de T/C en ratones SCID de los tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículos de control e IFN-beta-1a pegilado a las dosis de 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg y 1,6 mg/kg. Como se observó, los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado a dosis en el intervalo de 0,4 a 1,6 mg/kg demostraron una inhibición mayor del crecimiento de tumor en comparación con ratones tratados con cualquiera de los vehículos de control. La figura 13C ilustra el volumen tumoral en los ratones sin pelo de los tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-4 68 tratados con vehículo de control, IFN-beta-1a, o IFN-beta-1a pegilado. Como se observó, los ratones tratados con IFN-beta-1a pegilado demostraron una inhibición mayor del crecimiento de tumor en comparación con ratones tratados con IFN-beta-1a o vehículo de control.

La figura 14A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, 0,8 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado en solitario, 25 mg/kg de paclitaxel en solitario, y una combinación de 0,8 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado y 25 mg/kg de paclitaxel. La figura 14B resume el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, 0,8 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado en solitario, 25 mg/kg de paclitaxel en solitario y una combinación de 0,8 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado y 25 mg/kg de paclitaxel. La figura 15A ilustra el volumen tumoral en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, 1,6 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado en solitario, 25 mg/kg de paclitaxel en solitario, y una combinación de 1,6 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado y 25 mg/kg de paclitaxel. La figura 15B resume el % de T/C en ratones SCID de tumores de carcinoma humano de mama MDA-MB-231 tratados con vehículo de control, 1,6 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado en solitario, 25 mg/kg de paclitaxel en solitario y una combinación de 1,6 mg/kg de IFN-beta-1a pegilado y 25 mg/kg de paclitaxel. Como se observó en las figuras 14 y 15, la combinación de interferón beta 1a pegilado a 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg con paclitaxel demostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente superior en comparación con el tratamiento con los agentes únicos. Esto se confirma mediante las mediciones repetidas ANOVA seguido por los resultados del análisis estadístico de la prueba terminal de Dunnett (Anova-Dunnett) que muestran valores p de p<0,001 para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y paclitaxel contra ratones tratados con paclitaxel, y p<0,0001 para la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado y paclitaxel contra los ratones tratados con interferón beta 1a pegilado ratones.

35 EJEMPLO 5

Eficacia de IFN-beta-1a pegilado en ratones sin pelo que tienen melanoma humano WM-266-4

Ratones sin pelo de 8-10 semanas de edad de Charles River Lab se inocularon por vía subcutánea con 2×10^6 células de melanoma WM-266-4 con matrigel al 50 % en la región del costado. Cuando el volumen promedio de los tumores alcanzó aproximadamente 400 mm^3 , los ratones con tumor se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. Los ratones sin pelo con tumores WM-266-4 (400 mm^3) se dosificaron con vehículo de control, 0,1, 0,2, 0,4, o 0,8 mg/kg de PEG-IFN beta-1a SC BIW durante 4 semanas con seguimiento de dosis posterior. Los ratones se examinaron para la inhibición/regresión de tumor dependiente de la dosis y recrecimiento tumoral durante el seguimiento. En otro experimento, los ratones sin pelo con tumores WM-266-4 (200 mm^3) se dosificaron con vehículo de control, 0,4, 0,8, o 1,6 mg/kg de PEG-IFN beta-1a SC una vez a la semana (QW), dos veces a la semana (BIW), o tres veces a la semana (TIW) durante 4 semanas con seguimiento de dosis posterior. En el mismo estudio los tumores de control tratados con vehículo se dejaron crecer hasta un promedio de 2000 mm^3 . Después, los ratones se trataron con 0,8, o 1,6 mg/kg de PEG IFN beta-1a el día 46 dos veces a la semana durante 4 semanas (BIWX4).

Resultados: La figura 16 ilustra el volumen tumoral en ratones sin pelo de tumores de melanoma humano WM-266-4 tratados con vehículo de control, e interferón-beta-1a pegilado a 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg y 0,8 mg/kg. Como se observó, existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) en la inhibición del tumor entre los ratones tratados con vehículo de control y ratones tratados con dosis de 0,2-0,8 mg/kg. Los ratones presentaron además una inhibición/regresión del tumor dependiente de la dosis del fármaco y sobre el recrecimiento del tumor.

Las figuras 17A-C ilustran el volumen tumoral en los ratones sin pelo de tumores de melanoma humano WM-266-4 tratados con vehículo de control, 0,4 mg/kg, 0,8 mg/kg o 1,6 mg/kg de interferón-beta-1a pegilado una vez a la semana (QW), dos veces a la semana (BIW), o tres veces a la semana (TIW). Los ratones presentaron una inhibición/regresión del tumor dependiente de la dosis del fármaco y sobre el recrecimiento del tumor. La regresión del tumor de tumores grandes ($2000\text{-}2400 \text{ mm}^3$) también se observó en estos experimentos. Véase la figura 18. Las figuras 19A-C ilustran el efecto sobre la activación de la caspasa y la escisión de PARP en células de melanoma WM-266-4 tratadas con interferón-beta-1a pegilado durante 48 horas.

REIVINDICACIONES

1. Interferón-beta-1a pegilado para su uso en un método de tratamiento de carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho interferón-beta-1a pegilado a un sujeto en combinación con un inhibidor mitótico.
5
2. Un inhibidor mitótico para su uso en un método de tratamiento de carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho inhibidor mitótico a un sujeto en combinación con interferón-beta-1a pegilado.
10
3. Interferón-beta-la pegilado y un inhibidor mitótico para su uso en un método de tratamiento de carcinoma de mama, donde el tratamiento comprende administrar dicho interferón-beta-la pegilado y el inhibidor mitótico a un sujeto en combinación.
- 15 4. Interferón-beta-la pegilado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, un inhibidor mitótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o interferón-beta-la pegilado y un inhibidor mitótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el inhibidor mitótico es paclitaxel.
- 20 5. Interferón-beta-la pegilado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, un inhibidor mitótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 4, o interferón-beta-la pegilado y un inhibidor mitótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde el interferón-beta-la pegilado es un interferón-beta-la modificado en el grupo α -amino N-terminal con un único grupo mPEG-O-2-metilpropionaldehído lineal de 20 kDa.

FIGURA 1

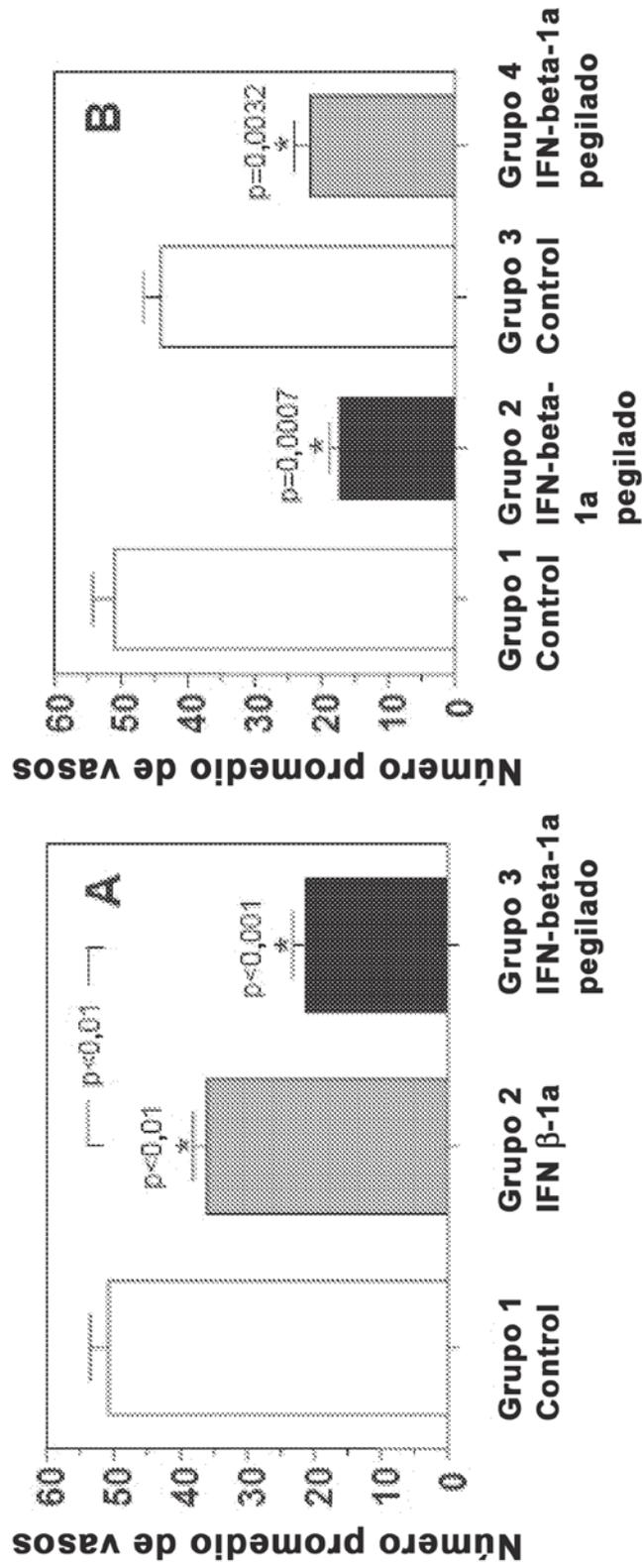


FIGURA 2

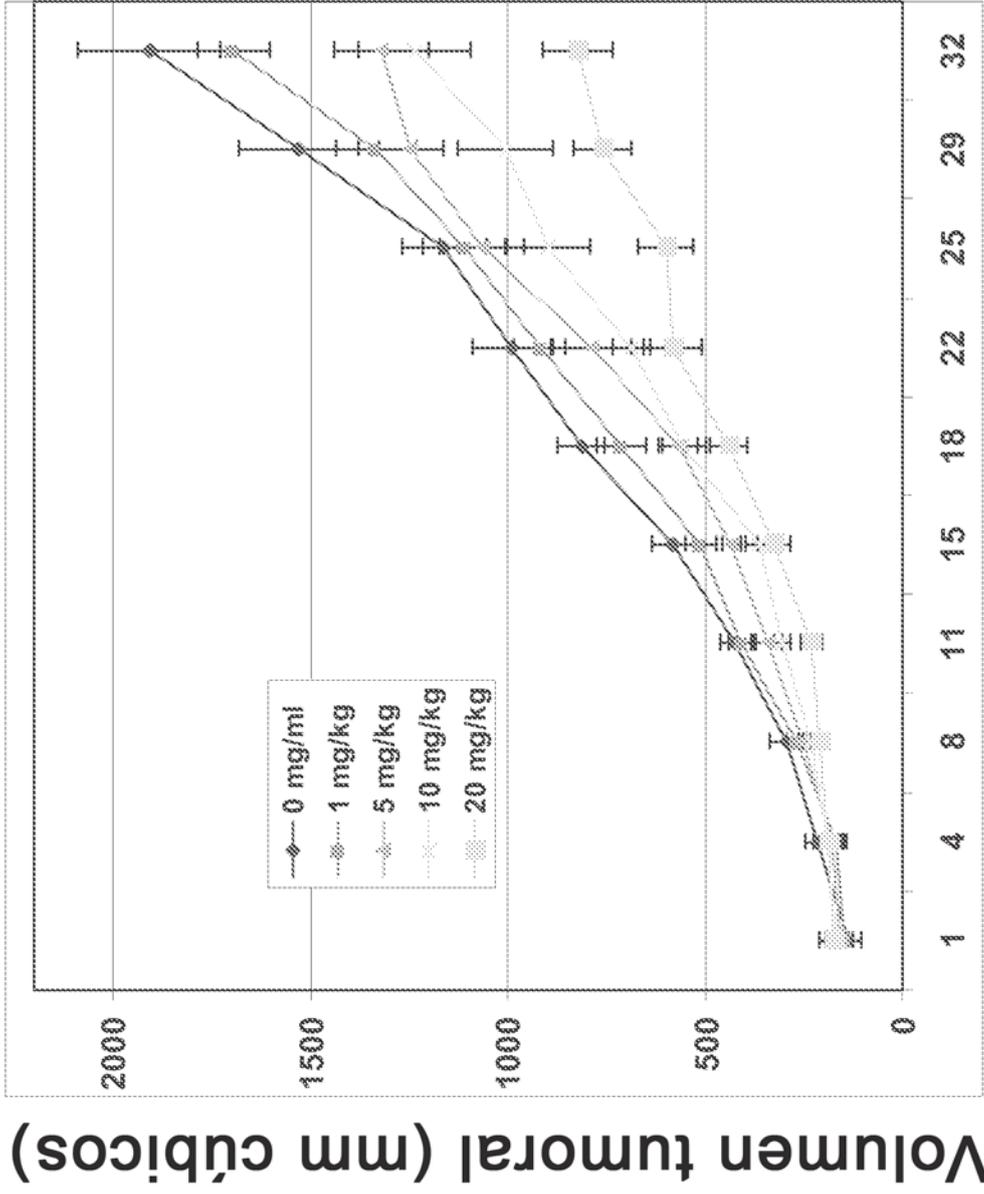
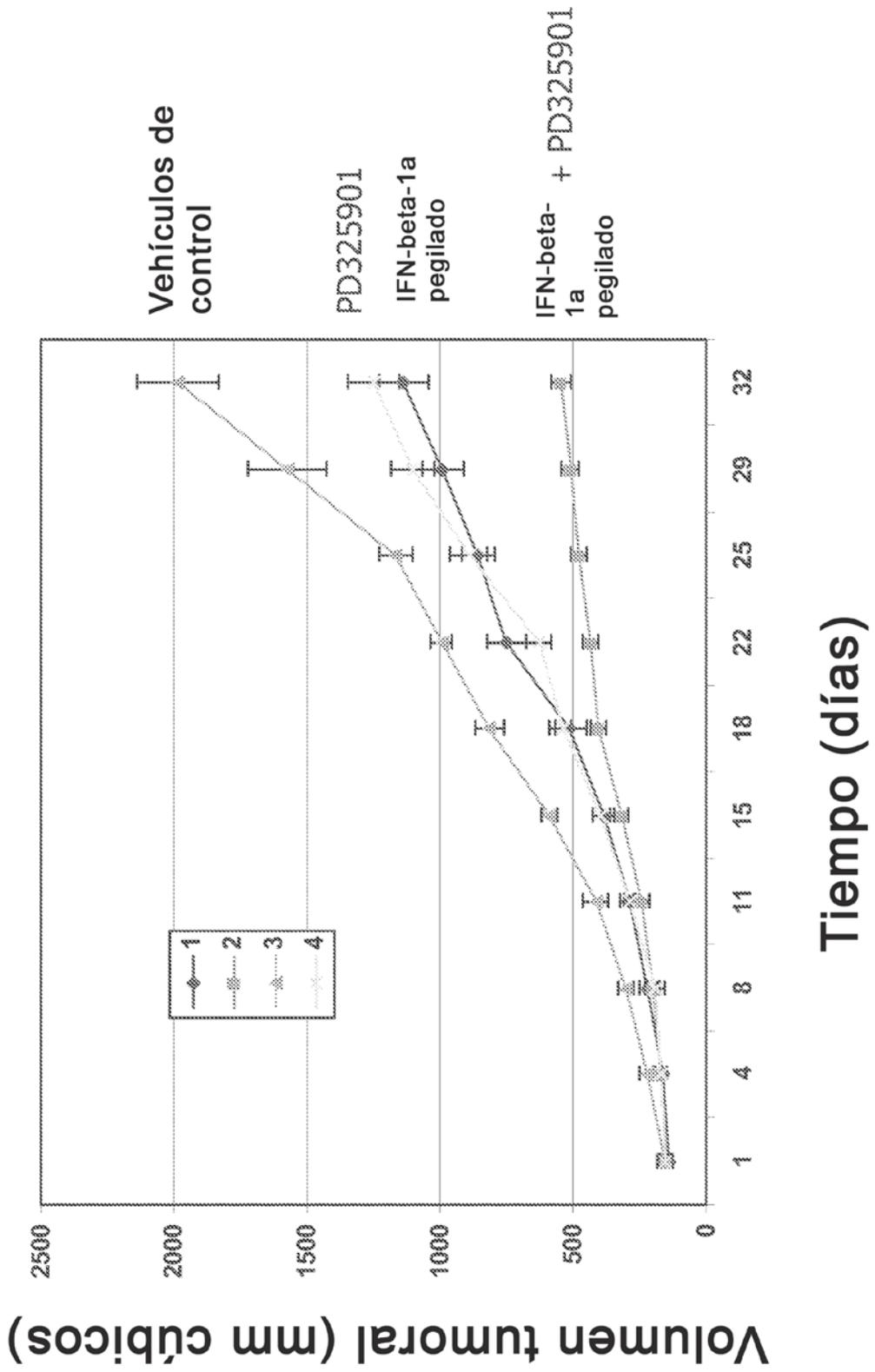


FIGURA 3



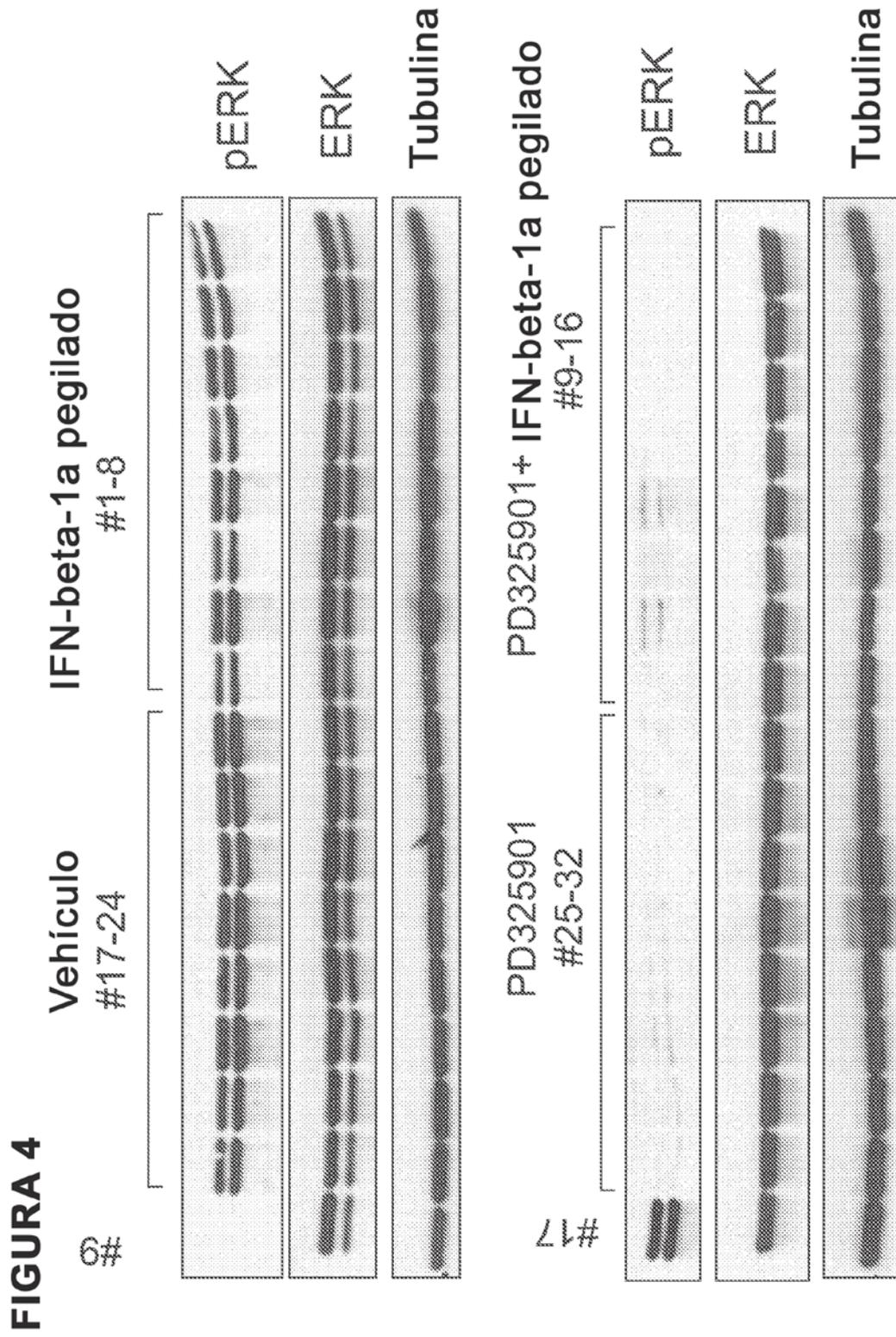


FIGURA 5

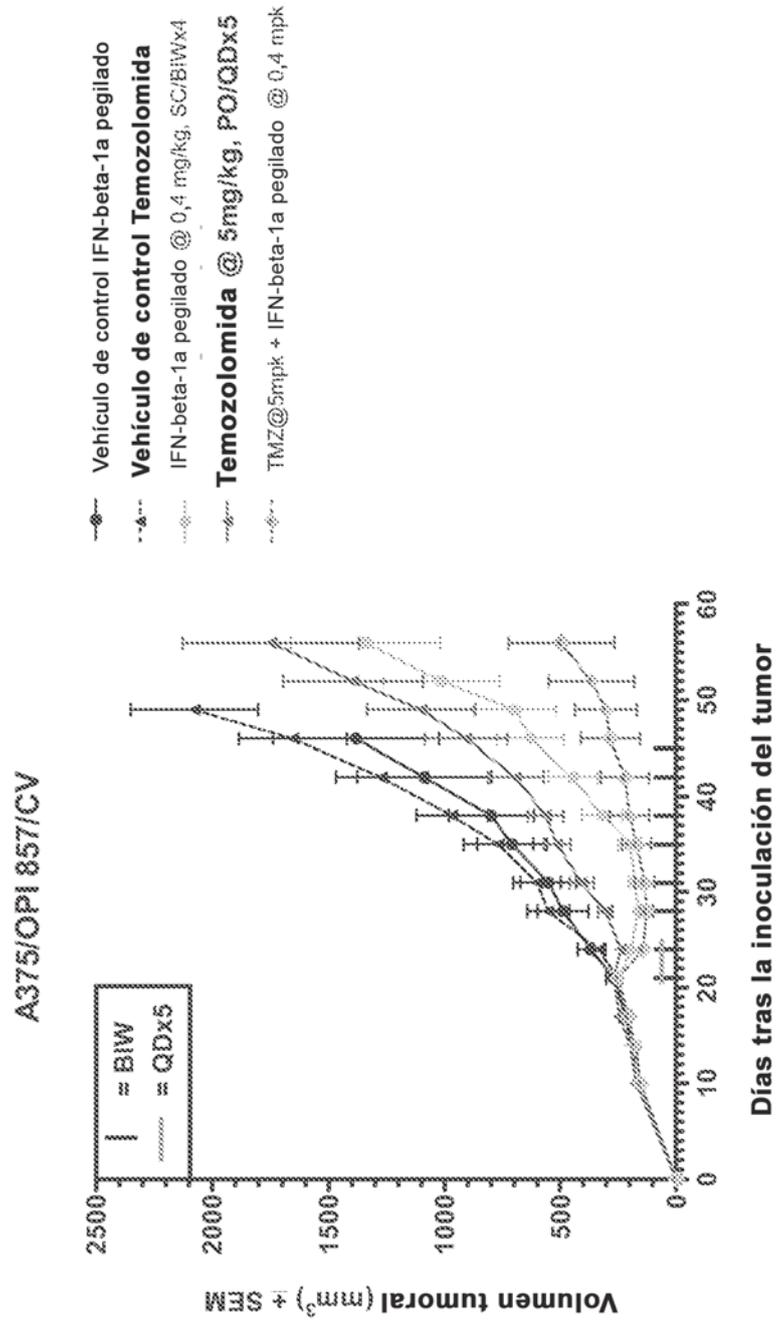


FIGURA 6A

ST#855/SN12C/CB17-SCIDS/XZ

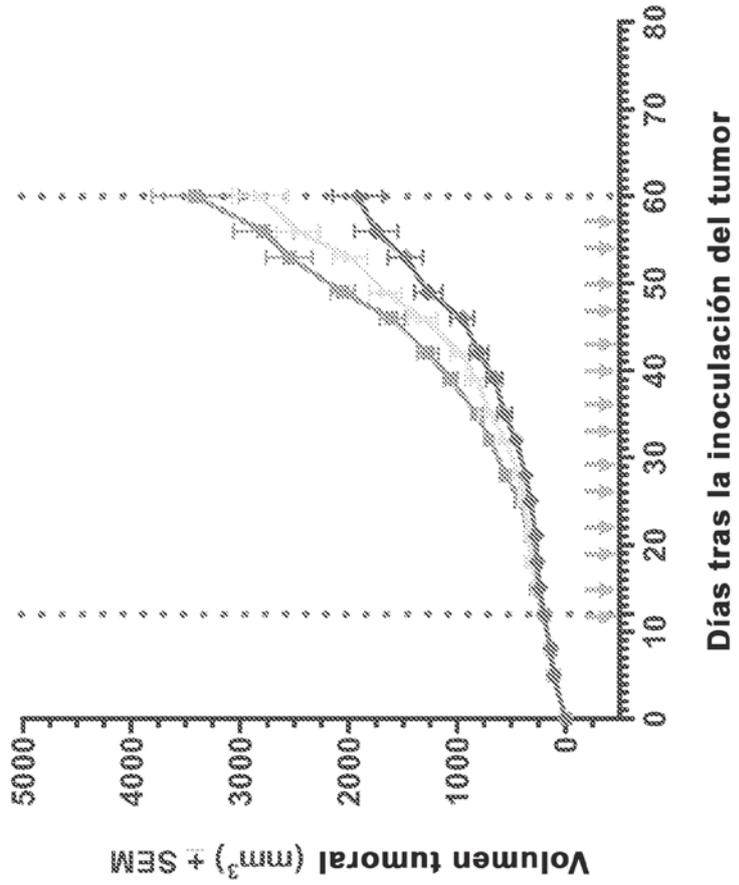


FIGURA 6B

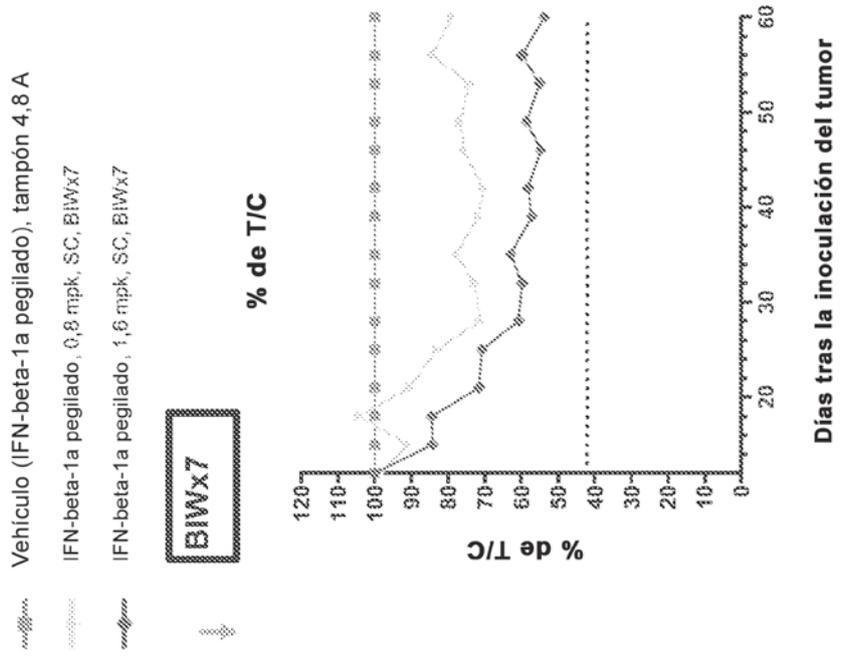


FIGURA 7A

ST#855/SN12C/CB17-SCIDS/XZ

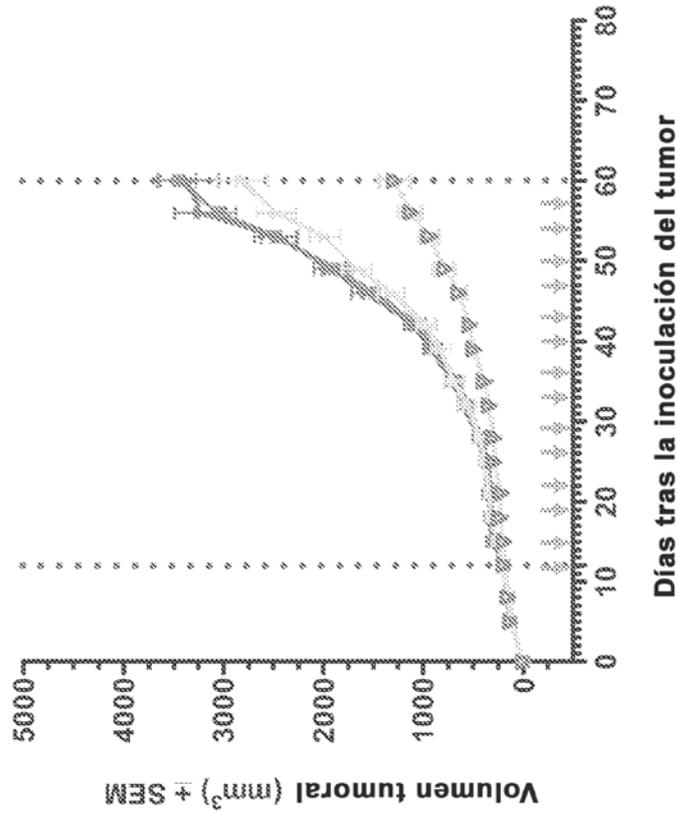


FIGURA 7B

- Vehículo combinado 4,8 A/CES
- ▲— Bevacizumab, 4mpk, IP, BIWx7
- IFN-beta-1a pegilado, 0,8mpk, SC, BIWx7
- ▽— IFN-beta-1a pegilado, 0,8mpk + Bevacizumab, 4mpk

BIWx7

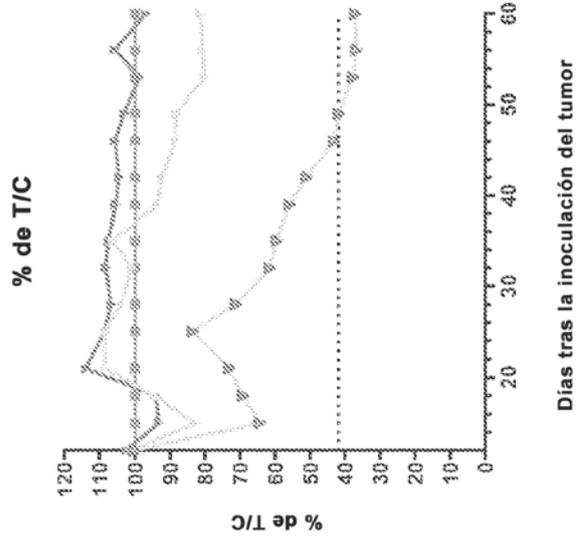


FIGURA 8A

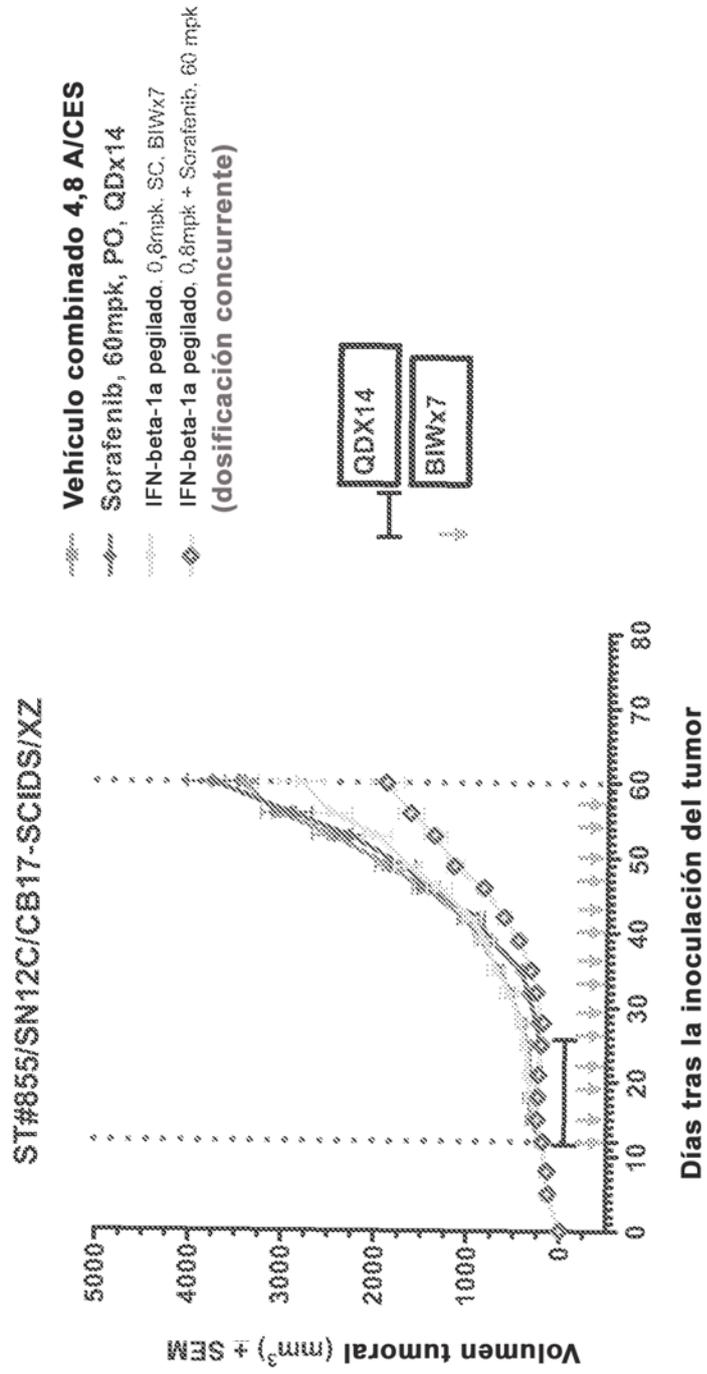


FIGURA 8B

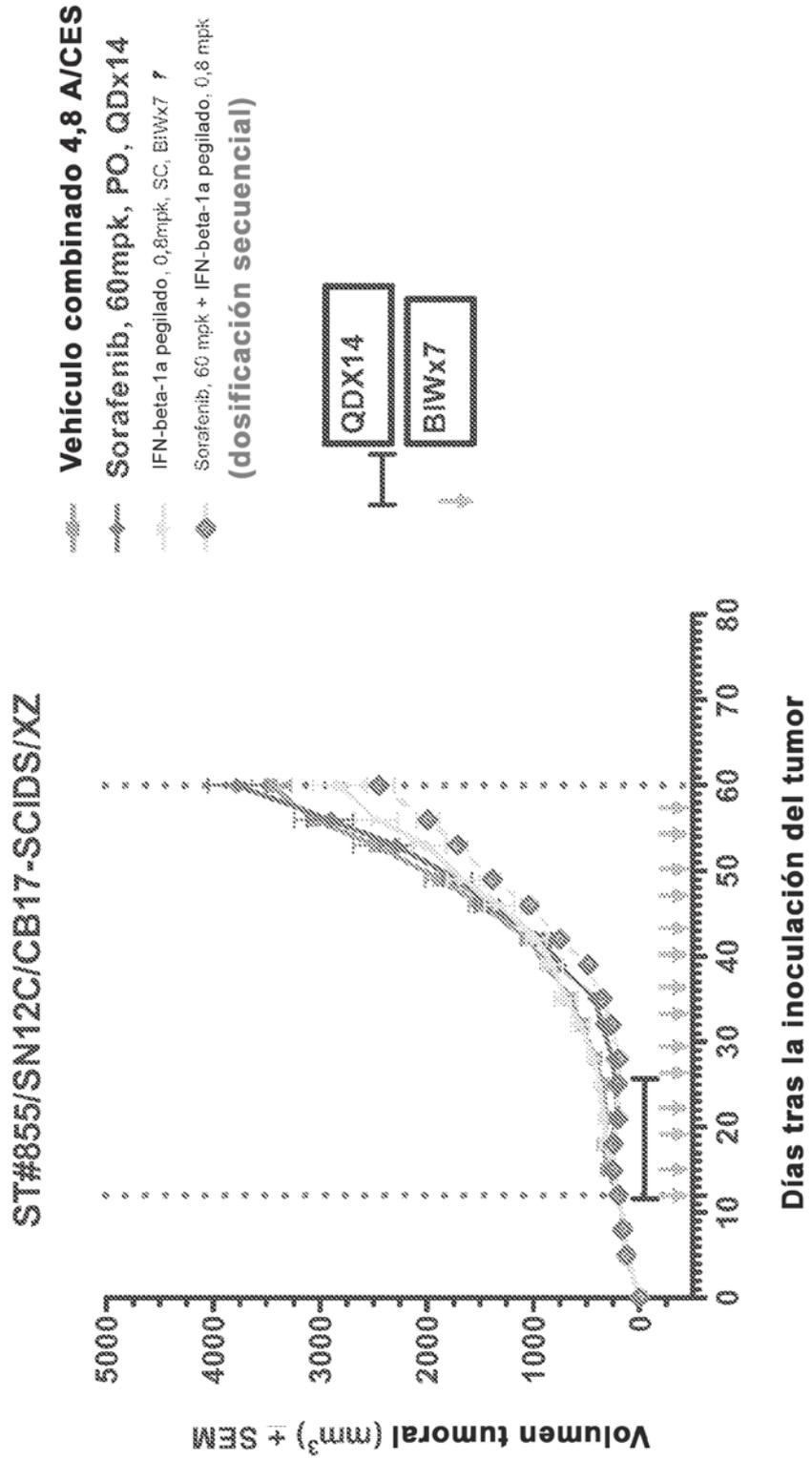


FIGURA 9A

ST#855/SN12/CB17-SCIDS/XZ

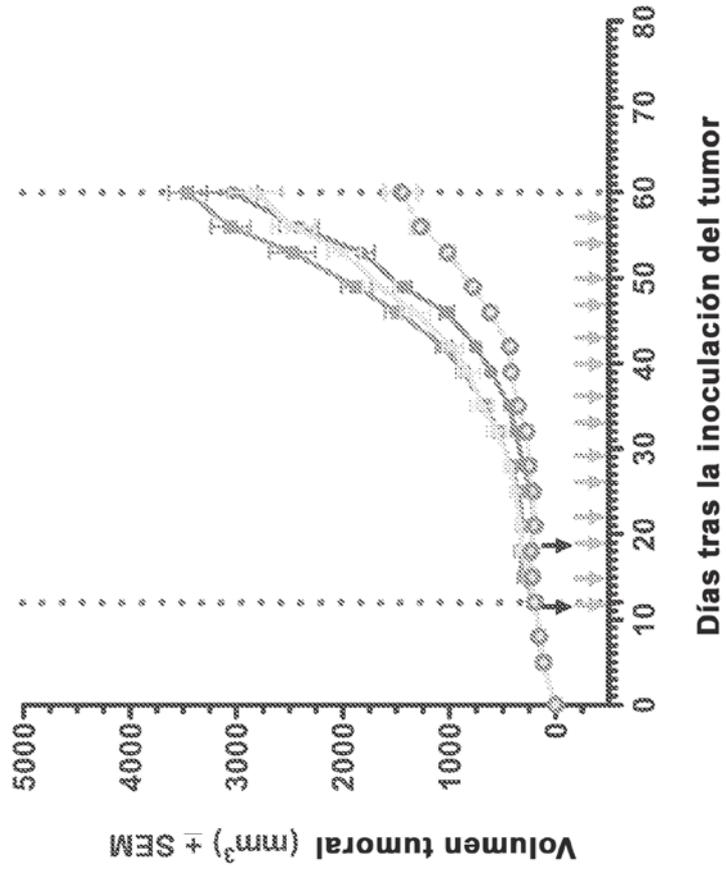


FIGURA 9B

Vehículo combinado 4,8 A/CES
Temozolomus, 50mpk, IP, Q7Dx2
 IFN-beta-1a pegilado, 0,6mpk, SC, BIWx7
 IFN-beta-1a pegilado, 0,6mpk + Temozolomus, 50 mpk

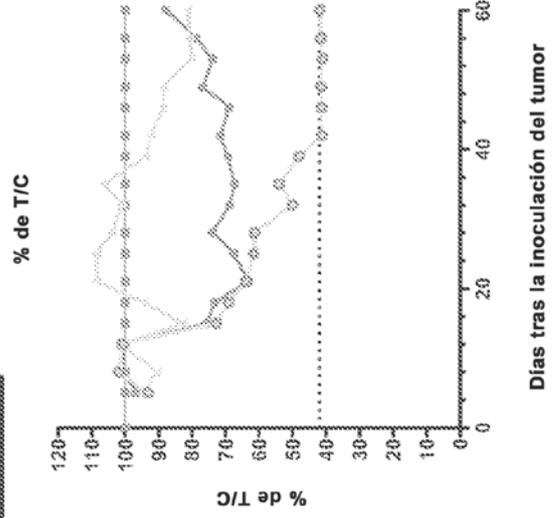
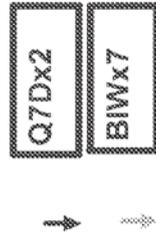


FIGURA 10

SW620/KLP/847/(nu/nu)

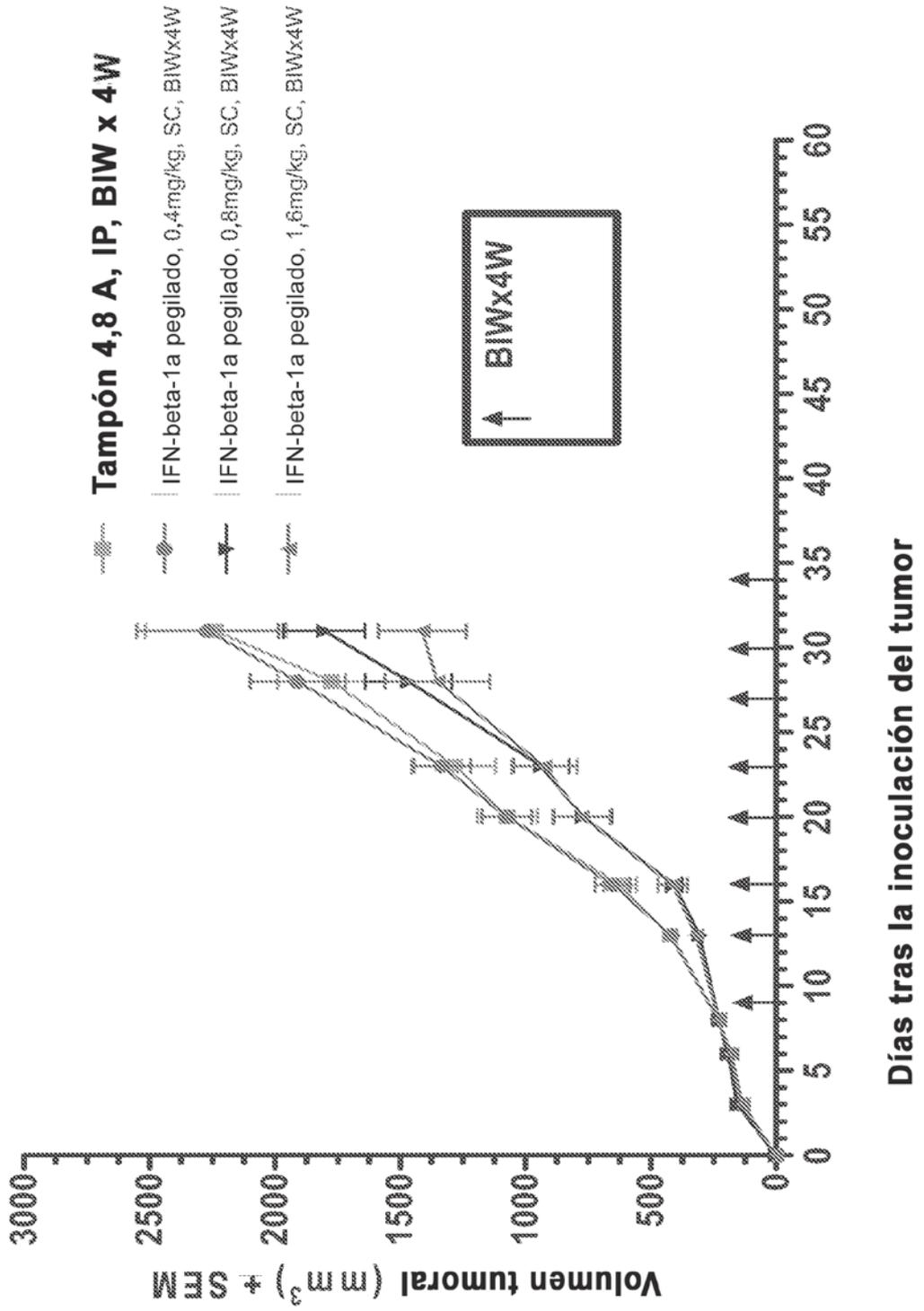


FIGURA 11

SW620/KLP/847/(nu/nu)

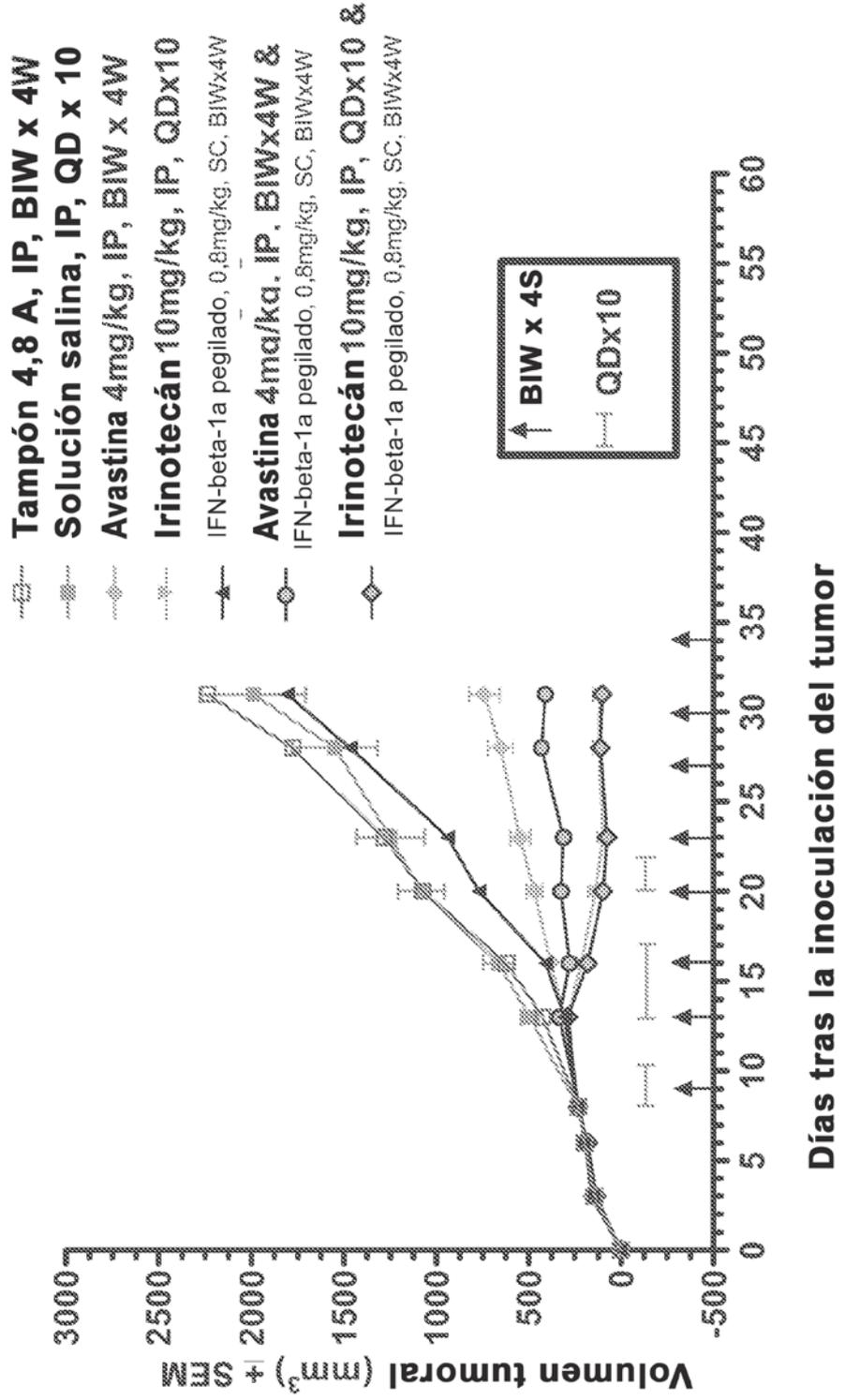


FIGURA 12

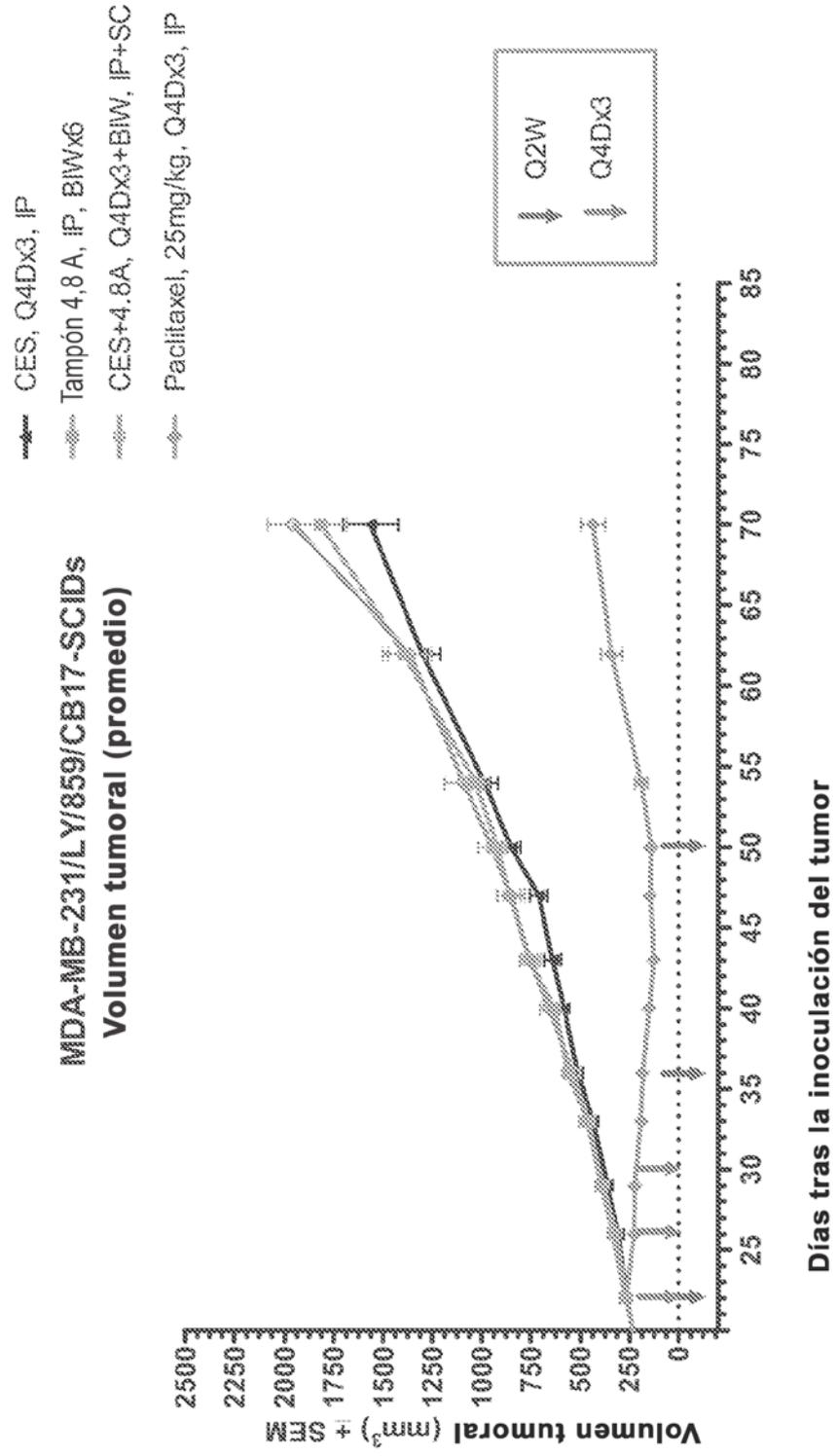


FIGURA 13A

MDA-MB-231/LY/859/CB17-SCIDs
Volumen tumoral (promedio)

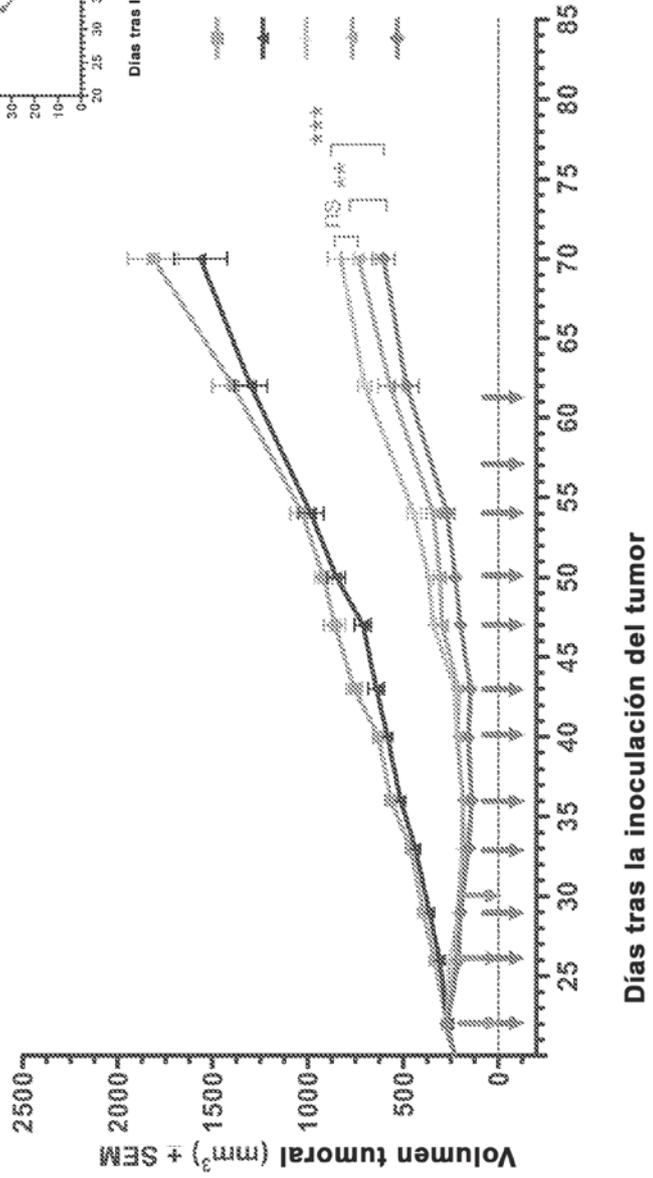


FIGURA 13B

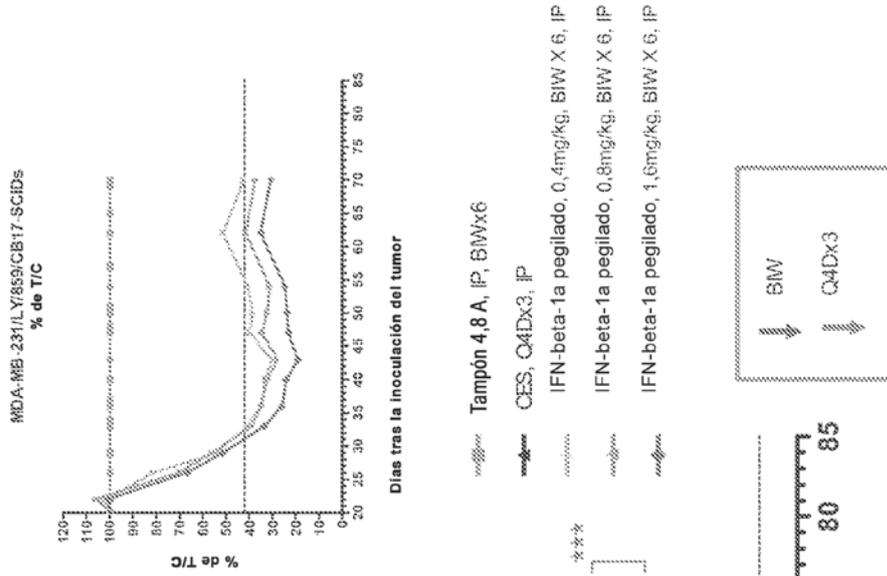


FIGURA 13C

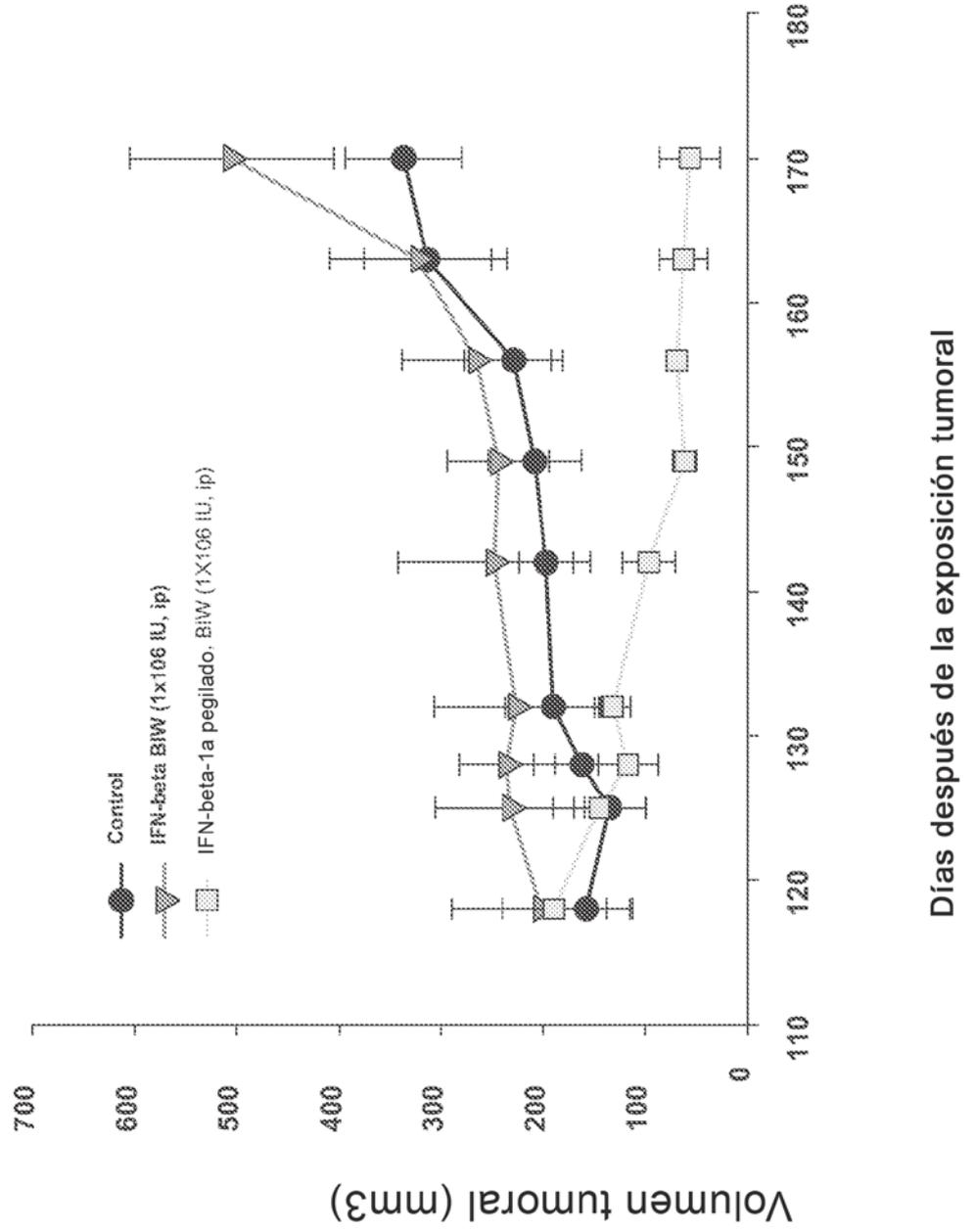
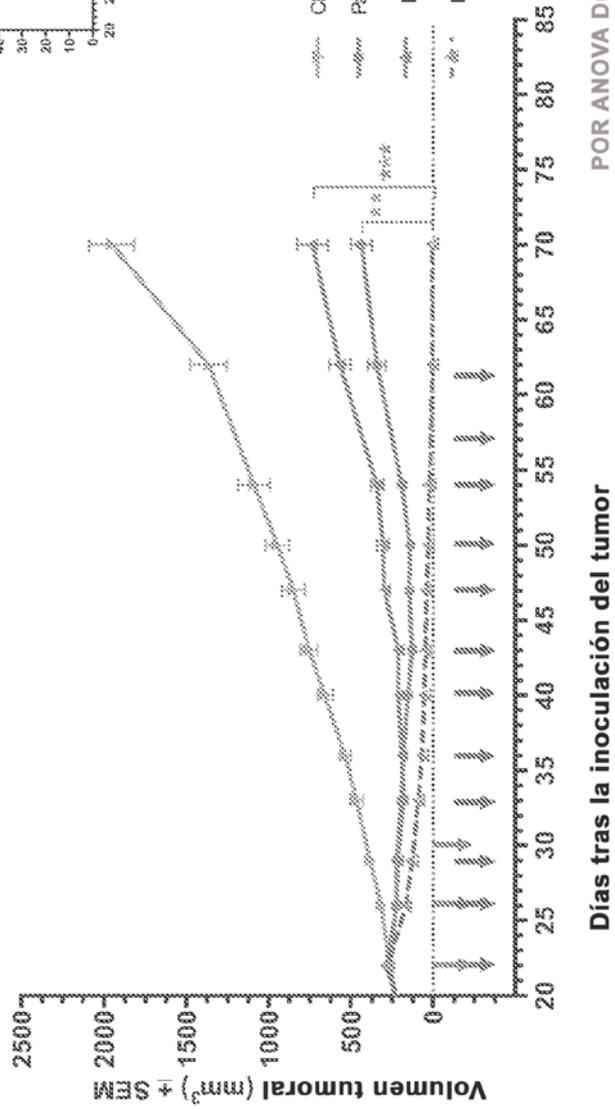


FIGURA 14A

**MDA-MB-231/LY/859/CB17-SCIDS
Volumen tumoral (promedio)**



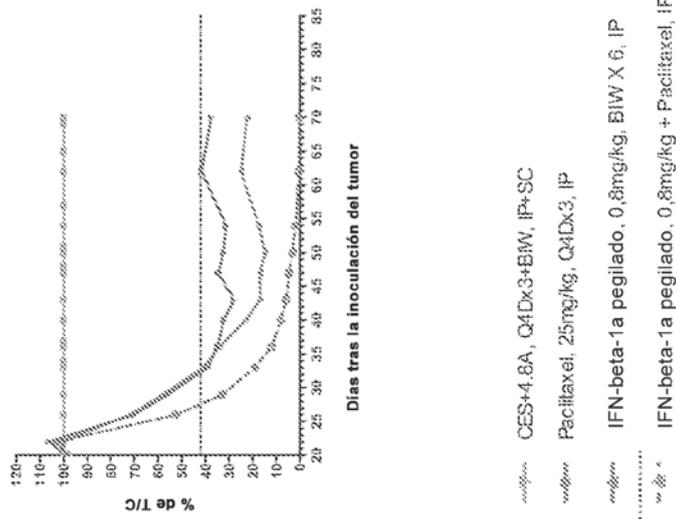
Días tras la inoculación del tumor

POR ANOVA Dunnett

** P<0,001 combo frente a pacitaxel

***P<0,0001 combo frente a 231/859

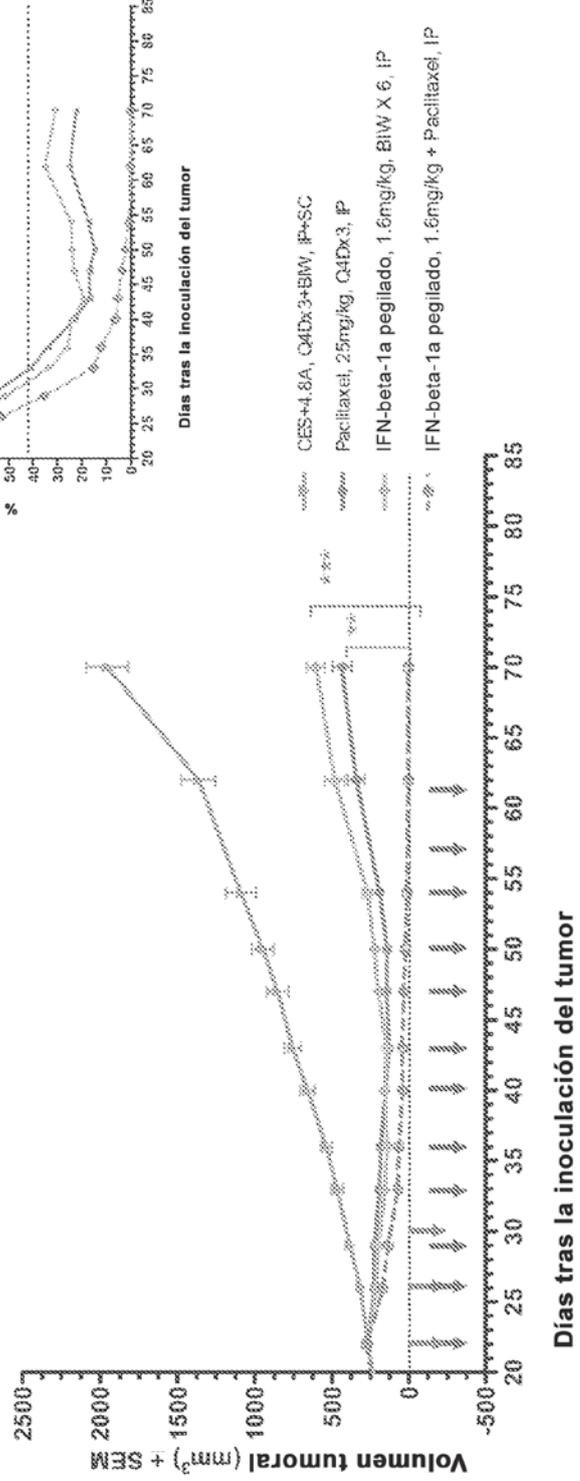
FIGURA 14B



Días tras la inoculación del tumor

FIGURA 15A

MDA-MB-231/LY/859/CB17-SCIDS
Volumen tumoral (promedio)



POR ANOVA Dunnett

** p<0,001 combo frente a paclitaxel

*** p<0,0001 combo frente a 5W X 6

FIGURA 15B

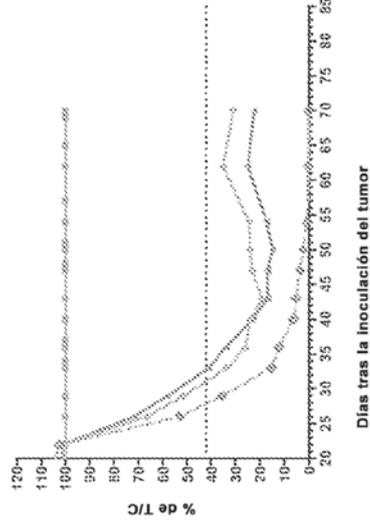


FIGURA 16

WM-266-4/AB/821

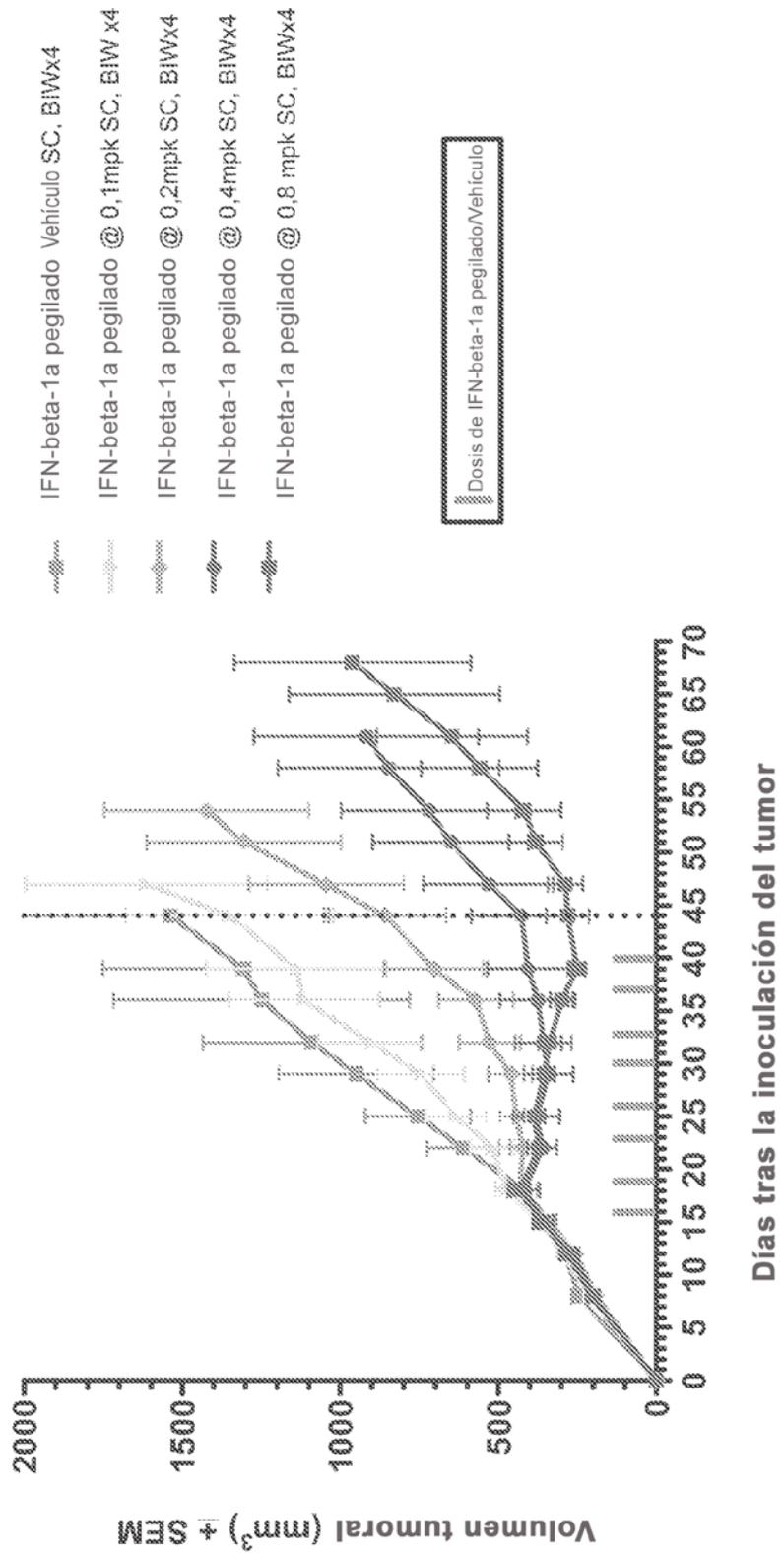


FIGURA 17A

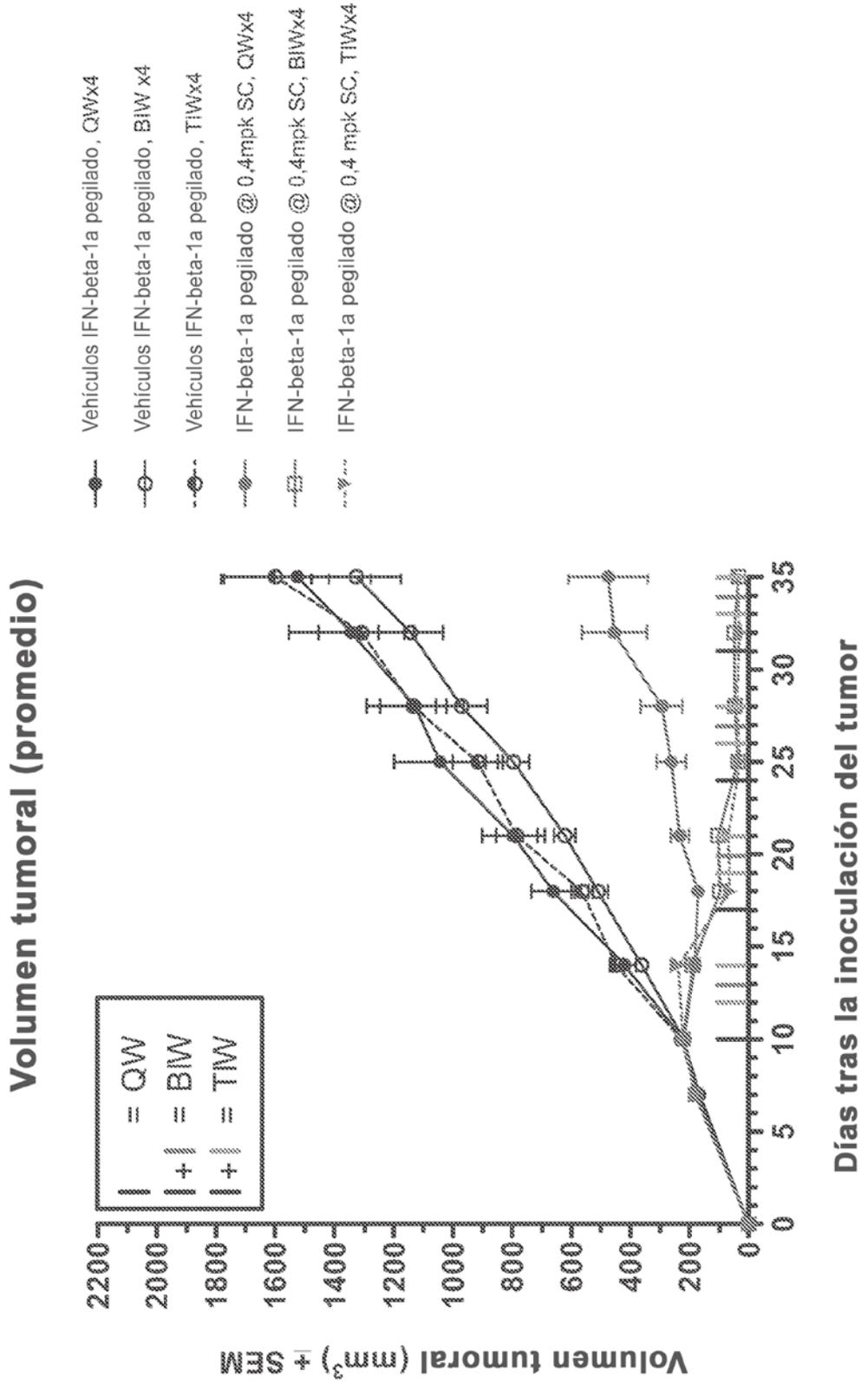


FIGURA 17B

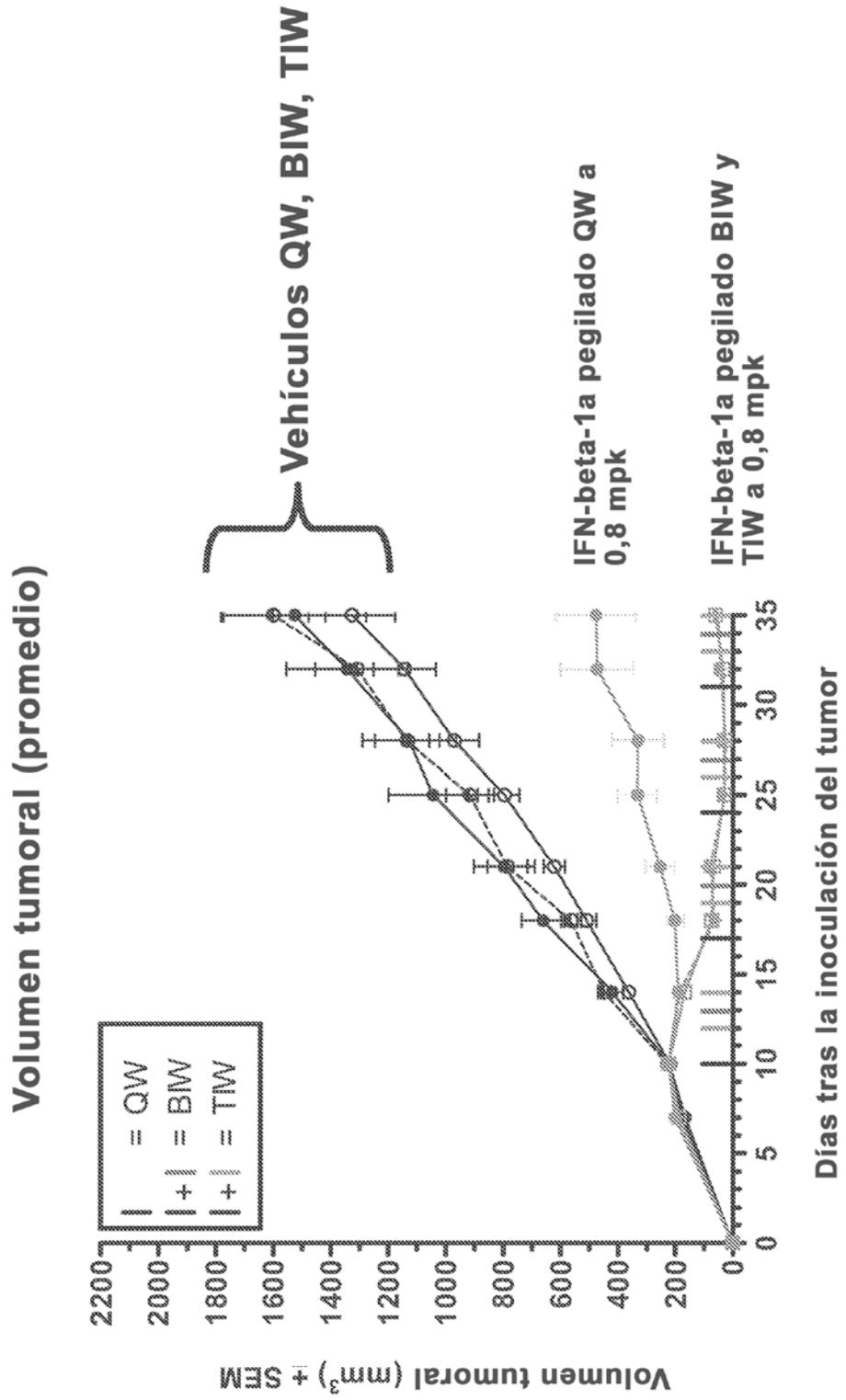


FIGURA 17C

Volumen tumoral (promedio)

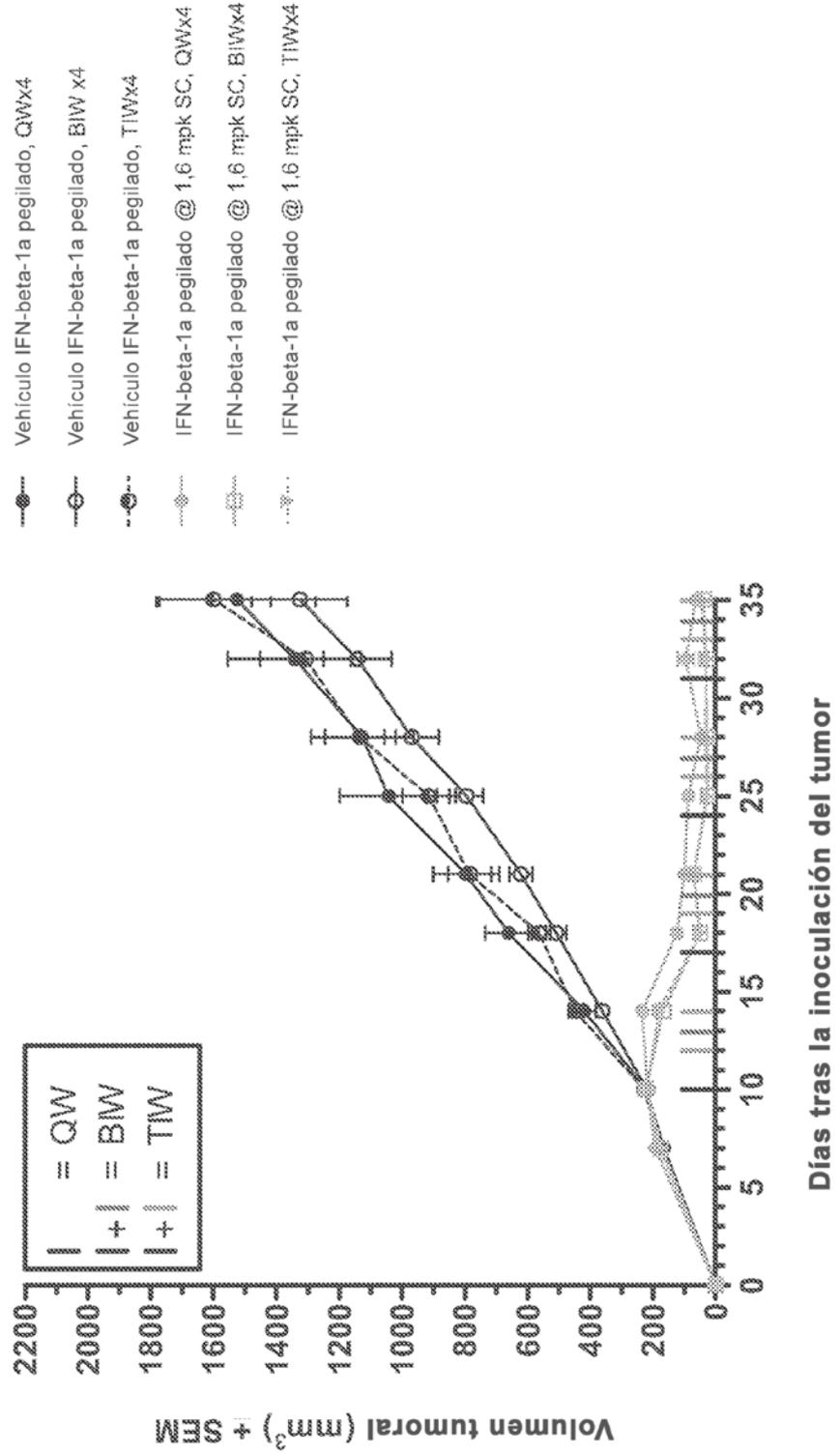


FIGURA 18

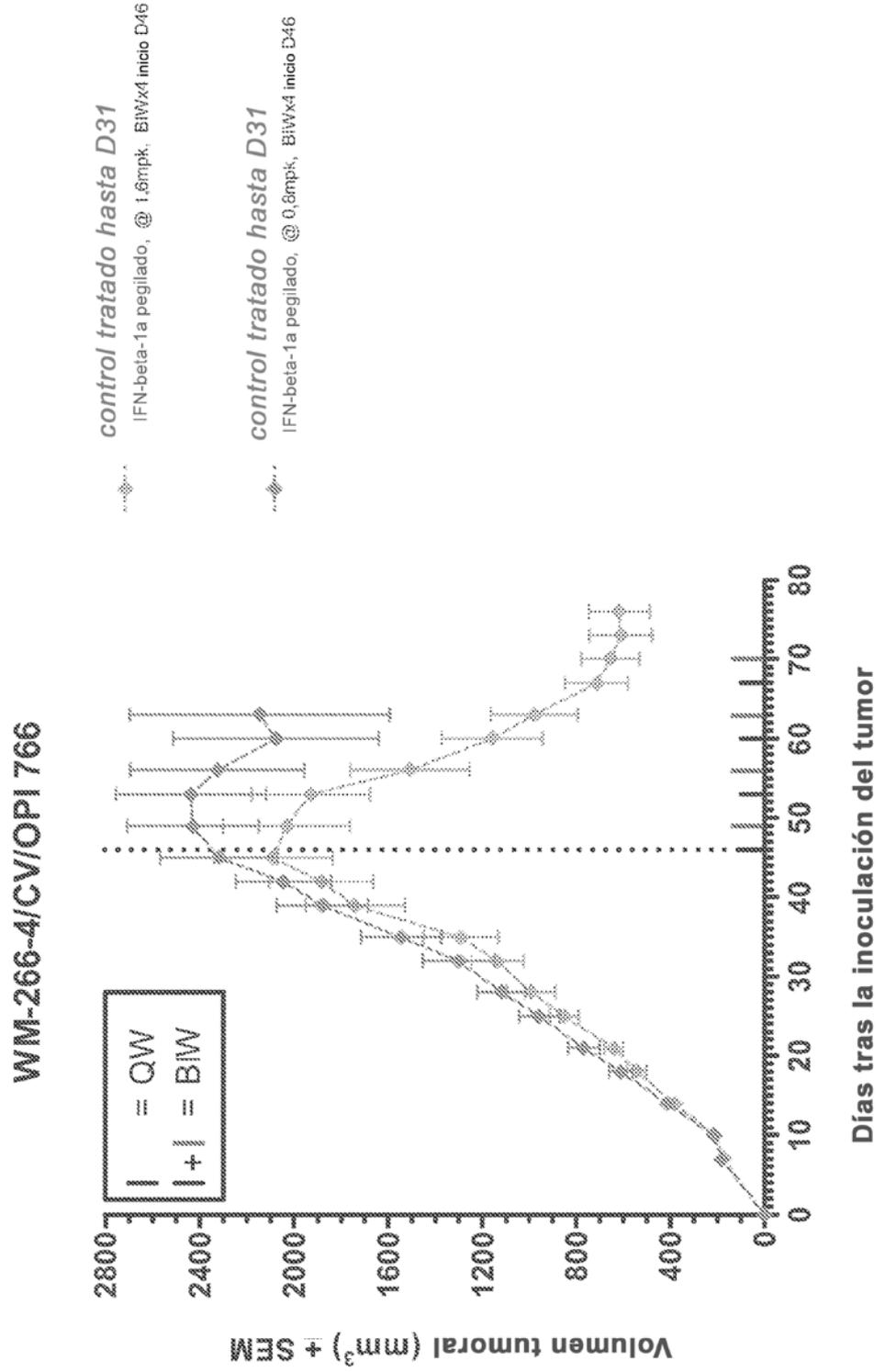


FIGURA 19A

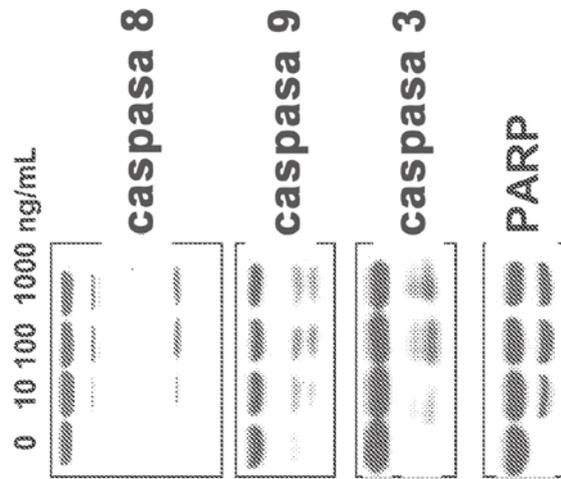


FIGURA 19B

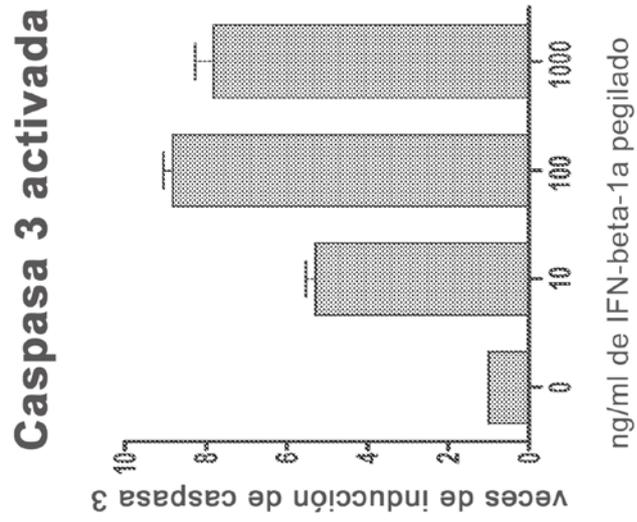


FIGURA 19C

