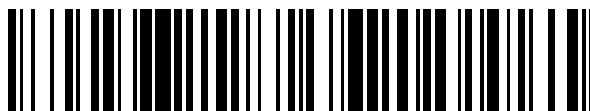


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 702**

51 Int. Cl.:

A61P 31/12 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014** **PCT/CN2014/090859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15070751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014** **E 14861341 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3068420**

54 Título: **Procedimientos para determinar interferón que tiene efectos inhibidores directos sobre tumores y usos del mismo**

30 Prioridad:

13.11.2013 US 201361903937 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2020

73 Titular/es:

SUPERLAB FAR EAST LIMITED (100.0%)
OMC Chambers P.O. Box 3152
Road Town, Tortola, VG

72 Inventor/es:

WEI, GUANGWEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 768 702 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

Procedimientos para determinar interferón que tiene efectos inhibidores directos sobre tumores y usos del mismo

Campo de la invención

La invención en el presente documento se refiere a procedimientos para determinar la potencia de un interferón de prueba con respecto al rSIFN-co, procedimientos para establecer equivalencia sustancial entre un interferón de prueba y el rSIFN-co, procedimientos para inhibir la migración de células cancerosas, formación de pseudópodos, actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TFC y nivel de beta-catenina, procedimientos para regular a la baja la expresión de receptores relacionados con Wnt o correceptores, procedimientos para inhibir la expresión de genes diana de la ruta de señalización Wnt, procedimientos de regulación al alza de genes supresores de tumores, así como kits de ensayo para la realización de cualquiera o todos estos procedimientos.

Antecedentes

El superinterferón (en adelante, "rSIFN-co" o "SIFN-I", un interferón que tiene el efecto terapéutico en tumores sólidos) se ha descrito en la patente de los Estados Unidos n.º 7.364.724 (Supercompuesto de interferón recombinante) y la patente de los Estados Unidos n.º 7.585.647 (Ácido nucleico que codifica interferón recombinante). El rSIFN-co se expresa desde un constructo de gen modificado por ingeniería genética que codifica la misma secuencia de aminoácido que el INFERGEN® (interferón alfacon-1), un interferón alfa consenso que se desveló en la patente de los Estados Unidos n.º 4.695.623. Sin embargo, el rSIFN-co está codificado por una nueva secuencia de ácido nucleico diferente de la que codifica al INFERGEN®. En comparación con INFERGEN®, la proteína del rSIFN-co tiene una estructura terciaria nueva y tiene propiedades biológicas mejoradas también.

El rSIFN-co tiene también un espectro más amplio de actividades biológicas en comparación con INFERGEN®, que incluyen efectos inhibidores directos sobre tumores sólidos así como actividades antivirales, como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 8.114.395, n.º 8.287.852 y n.º 8.425.896.

El documento US 2013/273527A1 se refiere en general a un procedimiento para inducir senescencia celular mediante interferón recombinante con configuración espacial alterada.

CHEN YAN ET AL, JOURNAL OF SICHUAN UNIVERSITY. MEDICAL SCIENCE EDITION SEP 2008, vol. 39, n.º 5, páginas 715-718 compara la potencia de diferentes interferones probando el efecto sobre células cancerosas cervicouterinas.

ZHENG y col., JOURNAL(MEDICAL SCIENCE EDITION), SECTION 3, No.17, vol. 41, n.º 1,28 Febrero 2010 (2010-02-28), páginas 29-34 estudia entre otras cosas las actividades anticancerígenas del supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co) e Infergen contra células cancerosas mamarias humanas.

THOMPSON y col., JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 54, n.º 3, (2010-07-17), páginas 506-512 explora el efecto de peg-IFN sobre la señalización de Wnt/beta-catenina *in vitro* e *in vivo*.

Sumario de la invención

A la luz de las actividades biológicas únicas del rSFIN-co en comparación con otros interferones disponibles comercialmente y el potencial del rSIFN-co para uso en seres humanos, es deseable proporcionar procedimientos para determinar la actividad biológica y/o potencia del rSIFN-co y otros interferones de prueba, por ejemplo, con fines de control de calidad durante el procedimiento de fabricación u otros, para asegurar que el producto final conserva o tiene las actividades deseadas y es diferente de los interferones disponibles comercialmente. Resulta deseable también proporcionar usos adicionales del rSIFN-co y de interferones o sustitutos de interferones que tengan las actividades deseadas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un interferón de prueba con respecto al rSIFN-co o que comprende: (1) proporcionar el interferón de prueba y el rSIFN-co; y (2) determinar la regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células HT-29 mediante el interferón de prueba y el rSIFN-co, *in vitro*, en las mismas condiciones especificadas, respectivamente, por lo cual la presencia de regulación a la baja de la expresión de LRP6 y FZD6 en células HT-29 de forma estadísticamente significativa, mediante el interferón de prueba significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma potencia, es decir, tienen la misma eficacia o pueden generar el mismo resultado. Para fines del presente documento, "lo mismo" significa al menos aproximadamente el 70 % lo mismo; opcionalmente, al menos aproximadamente el 80 % lo mismo; todavía opcionalmente, al menos aproximadamente el 90 % lo mismo; más opcionalmente, al menos aproximadamente el 95% lo mismo.

Según la etapa (2) una o más de las siguientes actividades puede determinarse, (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas; (c) Inhibición de la migración de células cancerosas; (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; (e) Regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células

cancerosas; (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas; por lo cual la presencia en el interferón de prueba de 1, o 2, o 3, o 4, o 5, o 6 de las actividades especificadas en (a), (b), (c), (d), (e) y (f), de forma estadísticamente significativa y/o la presencia en el interferón de prueba de una o más de las actividades especificadas en (g), (h) e (i), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co son equivalentes.

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar una o más actividades comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar una o más actividades comprenden una o más de: células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721, células PANC-1, células SW620, células SPC-A4, células H1299, células H460 y células HT-29.

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (a), inhibición del crecimiento de las células cancerosas *in vivo*, comprenden una o más de: células cancerosas hepáticas, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas de colon y células cancerosas pulmonares. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (a) comprenden una o más de: células SMMC-7721, células Hela, células HT-29, células SPC-A4 y células A549; opcionalmente, comprenden una o más de: células HT-29, células SPC-A4 y células A549; más opcionalmente, comprenden células A549. En algunas realizaciones, se utiliza suero salino normal o PBS como control para determinar la inhibición en la actividad (a). En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en días alternos. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra durante aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 6 semanas; opcionalmente, aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 semanas.

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), reducción de la viabilidad de células cancerosas, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co provoca(n) aproximadamente el 50 % de reducción de la viabilidad de las células cancerosas a una concentración en un intervalo entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 25 mcg/ml; opcionalmente, entre aproximadamente 10 mcg/ml y aproximadamente 18 mcg/ml; más opcionalmente, entre aproximadamente 10 mcg/ml y aproximadamente 15 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), el interferón de prueba y/o el rSIFN-co provoca(n) la reducción de la viabilidad de células cancerosas a un nivel sustancialmente indetectable a una concentración en un intervalo de al menos 25 mcg/ml; opcionalmente, al menos aproximadamente 50 mcg/ml; más opcionalmente, al menos aproximadamente 75 mcg/ml; más opcionalmente, al menos aproximadamente 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), las concentraciones del interferón de prueba y/o del rSIFN-co comprenden concentraciones en un intervalo entre aproximadamente 0,2 mcg/ml y aproximadamente 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), las células cancerosas se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos 1 día; opcionalmente, al menos aproximadamente 2 días. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas; opcionalmente, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721 y células PANC-1; opcionalmente comprenden una o más de: células A549, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721 y células PANC-1.

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) se tratan durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días; opcionalmente, aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células A549 y células SW620.

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c), inhibición de la migración de células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) comprenden una o más de: células A549 y células SW620. En algunas realizaciones, la inhibición de la migración de células cancerosas en la actividad (c) se determina utilizando el procedimiento Transwell. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo

de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas.

- 5 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d), inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d) comprenden una o más de: células A549, células H1299, células H460, células HT-29 y células SW620; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549, células H1299, células H460 y células SW620. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, la actividad transcripcional de la beta-catenina/TCF se determina mediante el uso de un sistema reportero. En algunas realizaciones, el sistema reportero comprende los plásmidos TOPFlash o pSV40-RL.

- 20 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e), regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) comprenden una o más de: células A549, células H460, células SW620 y células HT-29; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549, células SW620 y células HT-29; más opcionalmente, comprenden células HT-29. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (e), la expresión de LRP6 y/o FZD6 se establece mediante la determinación del nivel de ARNm de LRP6 y/o FZD6.

- 30 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f), inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2, comprenden células cancerosas pulmonares; opcionalmente, comprenden células A549. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (f) la expresión de Axin2, CD24, Survivina y/o ID2 se establece mediante la determinación de su correspondiente nivel de ARNm. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (f), cuando el interferón de prueba disminuye al menos aproximadamente el 30 %; opcionalmente, al menos aproximadamente el 40 %; más opcionalmente, al menos aproximadamente el 50 %; todavía más opcionalmente, al menos aproximadamente el 60 % la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en las células cancerosas en comparación con el control, se considera que el interferón de prueba y/o el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia o equivalencia sustancial.

- 45 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g), inhibición de la formación de pseudópodos, comprenden células cancerosas pulmonares; opcionalmente, células A549. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 4 días; opcionalmente, al menos aproximadamente 8 días. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml.

- 50 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h), inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) comprenden una o más de: células A549 y células SW480. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (h) se determina la inhibición de beta-catenina mediante transferencia Western. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 48 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 72 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml.

- 60 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i), regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas, comprenden una o más de: células

- cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) comprenden una o más de: células A549, células H460, células SW620 y células HT-29; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549 y células SW620. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (i) la expresión de DKK-3, KLF-4 y/o BATF2 se establece mediante la determinación de su correspondiente nivel de ARNm.
- En algunas realizaciones, la significación estadística quiere decir un valor de p menor que o igual a 0,05, o menor que o igual a 0,01, o menor que o igual a 0,005, o menor que o igual a 0,001, o menor que o igual a 0,0005, o menor que o igual a 0,0001, en comparación con un control.
- En algunas realizaciones, el control no se trata con el interferón de prueba o el rSIFN-co, o se trata con suero salino normal o PBS, o se trata con IFN α -2b, o el control es un control sin tratamiento (Señuelo).
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un compuesto, tal como un interferón de prueba, que comprende: (a) proveer una pluralidad de concentraciones del interferón de prueba; (b) determinar una respuesta a la primera dosis del interferón de prueba, utilizando la pluralidad de concentraciones del interferón de prueba, sobre la viabilidad de un primer conjunto de células cancerosas en condiciones específicas; (c) proveer una pluralidad de concentraciones del rSIFN-co; (d) determinar una respuesta a la segunda dosis del rSIFN-co, utilizando la pluralidad de concentraciones del rSIFN-co, sobre la viabilidad de un segundo conjunto de células cancerosas en las mismas condiciones especificadas; y (e) comparar la respuesta a la primera dosis con la respuesta a la segunda dosis. De tal manera, la potencia del compuesto, tal como el interferón de prueba, se determina con respecto al rSIFN-co.
- En algunas realizaciones, el rSIFN-co comprende una actividad específica determinada y la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a aproximadamente 1×10^9 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente $4,4 \times 10^8$ IU/mg a aproximadamente 9×10^8 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 5×10^8 IU/mg a aproximadamente 8×10^8 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 6×10^8 IU/mg a aproximadamente $7,5 \times 10^8$ IU/mg. Opcionalmente, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a 5×10^8 IU/mg.
- En algunas realizaciones, en los procedimientos para determinar o comparar la potencia de un compuesto, las concentraciones del interferón de prueba o del rSIFN-co están en un intervalo entre aproximadamente 0,2 mcg/ml y aproximadamente 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, las concentraciones del interferón de prueba o del rSIFN-co son al menos dos o más de las siguientes: 0,2 mcg/ml, 0,39 mcg/ml, 0,78 mcg/ml, 1,56 mcg/ml, 3,13 mcg/ml, 6,25 mcg/ml, 12,5 mcg/ml, 25 mcg/ml, 50 mcg/ml y 100 mcg/ml.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas se tratan con el interferón de prueba o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas, opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas, todavía opcionalmente, al menos aproximadamente 48 h y más opcionalmente, al menos aproximadamente 72 h.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona los procedimientos como se describen en el presente documento, en el que el rSIFN-co tiene una potencia para poder reducir la viabilidad de las células cancerosas en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 25 mcg/ml, dependiendo del tipo de célula cancerosa. En algunas realizaciones, el rSIFN-co tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las células en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 12,5 mcg/ml. En otra realización, el rSIFN-co tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las células en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 12,5 mcg/ml y 25 mcg/ml. En algunas realizaciones, el IC₅₀ del rSIFN-co está en el intervalo de aproximadamente 10 mcg/ml a aproximadamente 18 mcg/ml, opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml a aproximadamente 15 mcg/ml.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un compuesto, tal como un interferón de prueba, con respecto al rSIFN-co, sobre la viabilidad de células cancerosas, que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de células cancerosas; (b) probar un primer grupo de las células cancerosas con una cantidad del interferón de prueba en condiciones especificadas para generar un primer conjunto de datos de viabilidad; (c) tratar un segundo conjunto de células cancerosas con una cantidad eficaz del rSIFN-co en las mismas condiciones especificadas para generar un segundo conjunto de datos de viabilidad; y (d) comparar el primer conjunto de datos de viabilidad con el segundo conjunto de datos de viabilidad, por lo cual se determina la potencia del interferón de prueba.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas se tratan durante un intervalo desde aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días. En algunas realizaciones, el rSIFN-co se utiliza a una concentración en el intervalo de aproximadamente 6,25 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 7 mcg/ml a

aproximadamente 25 mcg/ml; más opcionalmente, aproximadamente 8 mcg/ml a aproximadamente 12,5 mcg/ml; todavía opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, el rSIFN-co se utiliza a una concentración en el intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml. En algunas realizaciones, el rSIFN-co comprende una actividad específica determinada.

- 5 En algunas realizaciones, las células cancerosas utilizadas en el presente documento se eligen de entre células tumorales humanas y células tumorales animales. En algunas realizaciones, las células tumorales son células tumorales pulmonares o células tumorales cervicouterinas o células tumorales hepáticas o células tumorales de colon o células tumorales mamarias o células tumorales pancreáticas o células tumorales prostáticas o células tumorales inducidas por virus o células transformadas viralmente. En algunas realizaciones, las células cancerosas se eligen de
10 al menos una de: células A549, células SPC-A4, células Calu-1, células CL-1, células H460, células H1299, células Hela, células HT-29, células Huh-7, células MDA-MB-231, células PANC-1, células RAW264.7, células SMMC-7721, células SW480 y células SW620.

- En algunas realizaciones, el interferón de prueba es también un interferón, que incluye un interferón obtenido de un lote de fabricación diferente del rSIFN-co. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del interferón de
15 prueba es al menos un 90 %, opcionalmente, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % idéntica a la del rSIFN-co (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el interferón de prueba es al menos un 90 %, opcionalmente, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % idéntica a la que codifica el rSIFN-co (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y están codificados por la misma secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2). En
20 algunas realizaciones, el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma actividad específica. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a aproximadamente 1×10^9 IU/mg. En algunas realizaciones, el interferón de prueba se puede obtener mediante un procedimiento que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia de polinucleótido mostrada en la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el interferón de prueba se elabora mediante la expresión del polinucleótido (SEQ ID
25 NO: 2) en una *E. coli* hospedadora, opcionalmente bajo el control del promotor P_{BAD} en una *E. coli* hospedadora.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la migración celular, tal como ocurre en la metástasis tumoral, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la migración celular.

- En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de rSIFN-co comprende aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente
30 100 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 8 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml; todavía opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml a aproximadamente 25 mcg/ml; más opcionalmente, aproximadamente 12 mcg/ml a aproximadamente 18 mcg/ml. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de rSIFN-co comprende aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml.

- En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de formación de pseudópodos en células cancerosas, que comprende la exposición de células cancerosas a una cantidad eficaz de rSIFN-co, durante un
35 período de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la formación de pseudópodos. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de rSIFN-co comprende aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml.

- En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF en células, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado. En algunas realizaciones, la actividad transcripcional mediada por beta-
40 catenina/TCF se determina empleando un sistema reportero, opcionalmente, un sistema reportero de luciferasa. En algunas realizaciones, el sistema reportero es el reportero TOPFlash. En algunas realizaciones, se utiliza el plásmido pSV40-RL.

- En otro aspecto, la invención adicionalmente proporciona un procedimiento para disminuir el nivel de proteína beta-catenina en células que comprende la exposición de células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un período de tiempo especificado. En algunas realizaciones, el nivel de proteína de beta-catenina se detecta mediante transferencia
45 Western utilizando su anticuerpo específico. En algunas realizaciones, se utiliza GAPDH como control.

- En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para regular a la baja la expresión de un receptor relacionado con Wnt o correceptor en células, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de
50 rSIFN-co por un tiempo especificado, por lo cual el receptor relacionado con Wnt o correceptor es regulado a la baja. En algunas realizaciones, el receptor relacionado con Wnt o correceptor comprende una proteína LRP, tal como la LRP6. En algunas realizaciones, el receptor relacionado con Wnt o correceptor comprende una proteína FZD, tal como la FZD6. En algunas realizaciones, la determinación de la expresión del receptor relacionado con Wnt o correceptor comprende determinar el nivel de ARNm de tal receptor o correceptor. En algunas realizaciones, se elabora ADNc correspondiente a dicho ARNm para determinar dichos niveles de ARNm.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de la expresión de ciertos genes en células, que incluye al menos un gen diana de la ruta de señalización Wnt, tal como en el tratamiento de una

enfermedad o proceso en el que el gen diana está sobreactivado. Dichos genes regulados a la baja incluyen los genes Axin2, CD24, Survivina y/o ID2. El procedimiento comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la expresión del gen diana.

En algunas realizaciones de la invención, el periodo de tiempo especificado para la exposición de las células al rSIFN-co es al menos de aproximadamente 12 h; opcionalmente, al menos aproximadamente 20 h; más opcionalmente, al menos aproximadamente 24 h; más opcionalmente, durante al menos aproximadamente 36 h; todavía opcionalmente, al menos durante aproximadamente 48 h; pero todavía opcionalmente, al menos aproximadamente 72 h. En algunas realizaciones, las células que se tratan mediante rSIFN-co son células cancerosas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de regulación al alza de la expresión de ciertos genes en células, que incluye al menos un gen supresor de tumor, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado, por lo cual la regulación al alza de la expresión al menos un gen supresor de tumor se efectúa. En algunas realizaciones, el gen regulado al alza comprende al menos uno de DKK3, KLF4 y BATF2. En algunas realizaciones, la expresión del gen regulado al alza se determina midiendo dicho nivel de ARNm. En algunas realizaciones, el ADNc se sintetiza de dicho ARNm y se amplifica opcionalmente para dichos fines de medición.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para establecer equivalencia sustancial entre un compuesto de prueba y el rSIFN-co en al menos uno, opcionalmente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los siguientes, que comprende comparar las actividades de los mismos y mostrar sustancialmente las mismas respuestas: (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas; (c) Inhibición de la migración de células cancerosas; (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; (e) Regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas; (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas. En algunas realizaciones, la invención proporciona el establecimiento de equivalencia sustancial en al menos 2 de las actividades mencionadas anteriormente; opcionalmente la invención proporciona el establecimiento de equivalencia sustancial en al menos 3 de las actividades mencionadas anteriormente; opcionalmente, en al menos 4 de las actividades mencionadas anteriormente; todavía opcionalmente, en al menos 5 de las actividades mencionadas anteriormente; más opcionalmente, en al menos 6 de las actividades mencionadas anteriormente; todavía más opcionalmente, en al menos 7 u 8 o 9 de las actividades mencionadas anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits de ensayo para calcular la potencia de un interferón de prueba, para inhibir la expresión de al menos un gen diana relacionado con Wnt, para la regulación al alza de un gen supresor de tumor y/o para la regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6, que comprende (a) el rSIFN-co y (b) al menos una de: instrucciones para realizar uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento y reactivos para llevar a cabo dichos procedimientos. El reactivo puede incluir tampón fosfato salino (PBS) o un tampón. En algunas realizaciones, el rSIFN-co en el kit de ensayo comprende una actividad específica determinada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un interferón o un sustituto de interferón, que comprende una o más actividades, opcionalmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 actividades seleccionadas de: inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; reducción de la viabilidad de células cancerosas; inhibición de la migración de células cancerosas; inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas; inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra las curvas de crecimiento de tumores de hepatoma humano, SMMC-7721, en ratones desnudos, como se describe en el Ejemplo 1, como se representa por el volumen de tumor relativo (VTR) medio, para cada uno de los grupos tratados con MMC (a 5 mg/kg) o rSIFN-co a 0,15 mg/ratón, 0,10 mg/ratón o 0,05 mg/ratón, o se inyectó con el vehículo, suero salino normal (NS) (0,15 ml/ratón), durante el periodo de 21 días después del inicio del tratamiento.

La FIG. 2 muestra las curvas de crecimiento de tumor cervicouterino humano en ratones desnudos, como se describe en el Ejemplo 2, como se representa por el VTR, para cada uno de los grupos tratados con MMC (a 5 mg/kg) o rSIFN-co a 0,15 mg/ratón, 0,10 mg/ratón, o 0,05 mg/ratón, o se inyectó con el vehículo, suero salino normal (0,15 ml por ratón), durante el periodo de tratamiento de 28 días. La FIG. 3 muestra las curvas de crecimiento de tumor de colon humano, HT-29, en ratones desnudos, como se describe en el Ejemplo 3, como se representa por el VTR para cada uno de los grupos tratados con MMC (a 5 mg/kg) o rSIFN-co a 0,15 mg/ratón, 0,10 mg/ratón, o 0,05 mg/ratón, o IFNalfa-2b a 0,15 mg/ratón, o se inyectó con el vehículo, suero salino normal (0,15 ml por ratón), durante el periodo de tratamiento de 28 días.

La FIG. 4 muestra las curvas de crecimiento de tumor de pulmón humano, SPC-A4, en ratones desnudos, como

se describe en el Ejemplo 4, como se representa por el VTR para cada uno de los grupos tratados con MMC (a 5 mg/kg) o rSIFN-co a 0,15 mg/ratón, 0,10 mg/ratón, o 0,05 mg/ratón, o IFN α -2b a 0,15 mg/ratón, o se inyectó con el vehículo, suero salino normal (0,15 ml por ratón), durante el periodo de tratamiento de 21 días.

La FIG. 5 muestra las curvas de respuesta a la dosis sobre la viabilidad de diferentes células tumorales después del tratamiento durante 48 h con rSIFN-co o IFN α -2b (IFN α -2b) a las concentraciones indicadas en mcg/ml (μ g/ml): 0, 0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,50, 25, 50 y 100. Las células de prueba fueron: células tumorales pulmonares A549 (FIG. 5A); células tumorales cervicouterinas Hela (FIG. 5B); células tumorales hepáticas CL-1 (FIG. 5C); células tumorales hepáticas Huh-7 (FIG. 5D); células tumorales de colon SW480 (FIG. 5E); células tumorales mamarias MDA-MB-231 (FIG. 5F); células tumorales pulmonares Calu-1 (FIG. 5G); células tumorales hepáticas SMMC-7721 (FIG. 5H); y células tumorales pancreáticas PANC-1 (FIG. 5I). Los resultados se expresan como un porcentaje de la viabilidad celular respecto a las células control y representan la media de al menos dos experimentos independientes.

La FIG. 6 contiene las curvas de viabilidad que muestran el efecto del tratamiento con IFN α -2b y con rSIFN-co, respectivamente, a 10 mcg/ml, sobre la viabilidad de las células A549 (FIG. 6A) y las células SW620 (FIG. 6B) tras el tratamiento durante el número indicado de días: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los resultados se expresan como un porcentaje de la viabilidad celular respecto a las células control y representan la media de al menos 2 experimentos independientes. (**p<0,01)

La FIG. 7 contiene microfotografías que muestran el efecto del tratamiento con rSIFN-co (FIG. 7, columna C) y con IFN α -2b (FIG. 7, columna B), respectivamente, en comparación con el control Señuelo (FIG. 7, columna A) sobre células cancerosas pulmonares, A549, sobre la formación de colonias después de 4 días (fila 1) (ampliada 100x) y la formación de pies invasivos (pseudópodos) después de 8 días (filas 2 y 3) (ampliada 400x), en cultivo 3D. Las flechas negras en las columnas A y B señalan los pseudópodos que sobresalen de las células cancerosas. Las flechas con una estrella en la columna C señalan células sin pseudópodo.

En la FIG. 8, A-E son diagramas de barras que muestran el efecto del tratamiento con rSIFN-co e IFN α -2b, respectivamente, sobre la actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF en diferentes células cancerosas pulmonares: A549 (FIG. 8A); H1299 (FIG. 8B); y H460 (FIG. 8C); y diferentes células cancerosas de colon: HT-29 (FIG. 8D); y SW620 (FIG. 8E) en comparación con el control señuelo. Los valores resultaron de la media de 3 experimentos. (*p<0,05, **p<0,01).

En la FIG. 9, A y B, son diagramas de barras que muestran el efecto del tratamiento con rSIFN-co e IFN α -2b, respectivamente, en comparación con el control señuelo sobre la expresión de los receptores relacionados con Wnt o correceptores, LRP6 (FIG. 9A) y FZD6 (FIG. 9B) en diferentes células cancerosas medido mediante los niveles de ARNm con respecto a la expresión de GAPDH: A549, H460, SW620 y HT-29. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se normalizaron con el grupo de control señuelo.

En la FIG. 10, A y B, son transferencias Western que muestran el efecto del tratamiento con rSIFN-co e IFN α -2b, respectivamente, en comparación con el control señuelo, sobre el nivel de proteína beta-catenina en células cancerosas: A549 (FIG. 10A) y SW480 (FIG. 10B), después de 24, 48 y 72 h de tratamiento, respectivamente. La expresión de GAPDH se utilizó como control. El experimento se realizó por triplicado.

En la FIG. 11, A - D, son diagramas de barras que muestran el nivel de expresión relativo de ARNm de cuatro (4) genes que se encuentran corriente abajo de la ruta de señalización Wnt después de tratar células cancerosas pulmonares A549 durante veinticuatro (24) horas con rSIFN-co o IFN α -2b, en comparación con el control señuelo: Axin2 (FIG. 11A); CD24 (FIG. 11B); Survivina (FIG. 11C); e ID2 (FIG. 11D). El experimento se realizó por triplicado y se normalizó con el grupo de control señuelo.

En la FIG. 12, A - C, son diagramas de barras que muestran el nivel de expresión relativo de ARNm de 3 genes supresores de tumores: DKK-3 (FIG. 12A); BATF2 (FIG. 12B); y KLF4 (FIG. 12C) en diferentes células tumorales: A549, H460, SW620 y HT-29, que se trataron con rSIFN-co o IFN α -2b, en comparación con el control señuelo. El experimento se realizó por triplicado y se normalizó con el grupo de control señuelo.

En la FIG. 13, A y B, son diagramas de barras que muestran la migración de células tumorales después del tratamiento con rSIFN-co o IFN α -2b en comparación con los controles Señuelo, para células A549 (FIG. 13A) y células SW620 (FIG. 13B). Los resultados se presentan como el número medio de células que migran por campo $\pm$ SD después de dicho tratamiento. (**p<0,01)

La FIG. 14 muestra transferencias Western, teñidas con anticuerpos específicos de procaspasa-3, caspasa-3 escindida, procaspasa-8, caspasa-8 escindida, PARP y beta-tubulina (β -tubulina), de células A549 (FIG. 14A) y células SW620 (FIG. 14B) después de que se trataran con IFN α -2b o rSIFN-co durante 24 h o 48 h en comparación con los controles Señuelo y las células tratadas con 5FU, respectivamente.

La FIG. 15 muestra transferencias Western, teñidas con anticuerpos específicos de P-STAT1, STAT1, P-STAT2, STAT2, P-STAT3, STAT3 y GAPDH, después de que se trataron células A549 con IFN α -2b (FIG. 15A) a 10 mcg/ml o rSIFN-co (FIG. 15B) a 10 mcg/ml o después de que se trataron células Hela con IFN α -2b (FIG. 15C) a 10 mcg/ml o rSIFN-co (FIG. 15D) a 10 mcg/ml.

La FIG. 16 muestra una curva de crecimiento tumoral reflejando la inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con IFN α -2b o rSIFN-co en comparación con los controles tratados con PBS durante un periodo de 27 días después del inicio del tratamiento. Los datos se presentan como el volumen de tumor medio (mm³) $\pm$ SD (n=8).

Descripción detallada

Definiciones

Si no se indica otra cosa, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tendrán los significados dados por los expertos en la materia o aquellos comúnmente conocidos por los expertos en la materia.

Además, salvo que el contexto exija otra cosa, los términos en singular incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular.

- 5 Además, como se utiliza en el presente documento, el término "o" significará "y/o" si no se indica otra cosa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto" significará cualquier proteína (incluyendo cualquier anticuerpo, cualquier fragmento de anticuerpo activo y cualquier proteína dimérica o multimérica), polipéptido, molécula pequeña y otras moléculas que tengan una o más actividades biológicas.

- 10 El término "comprende" o "que comprende" tal como se utiliza en el presente documento se entenderá ampliamente y sin limitaciones e incluirá "es" o "son".

Los términos "proceso" y "enfermedad" tal como se utilizan en el presente documento pueden utilizarse indistintamente o juntos para indicar una enfermedad, infección, inflamación, cáncer, un efecto secundario provocado por el tratamiento u otras causas de mala salud en un individuo.

- 15 La expresión "cantidad eficaz" tal como se utiliza en el presente documento significará una cantidad que produce el efecto deseado, tal como para la reducción de viabilidad celular, regulación a la baja o regulación al alza de la expresión o actividad de una proteína o tratamiento de una enfermedad o proceso.

La expresión "que establece equivalencia sustancial" tal como se utiliza en el presente documento significará que se lleva a cabo cierta prueba o pruebas para demostrar sustancialmente el mismo nivel de respuesta, actividad, eficacia o resultado, dentro de los límites del error experimental (tal como $\pm$ desviación estándar (SD)).

- 20 La expresión "sustancialmente lo mismo" tal como se utiliza en el presente documento significará al menos aproximadamente el 70 % lo mismo; opcionalmente, al menos aproximadamente el 80 % lo mismo; todavía opcionalmente, al menos aproximadamente el 90 % lo mismo; más opcionalmente, al menos aproximadamente el 95% lo mismo.

- 25 Las expresiones "en el intervalo de aproximadamente" o "en el intervalo entre aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento significará el número especificado en el intervalo más todas las unidades y puntos decimales entre dicho intervalo especificado. Por ejemplo, "en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a aproximadamente 5×10^8 IU/mg" incluirá 4×10^8 IU/mg, $4,1 \times 10^8$ IU/mg, $4,2 \times 10^8$ IU/mg, $4,3 \times 10^8$ IU/mg, $4,4 \times 10^8$ IU/mg y similares y "8 mcg/ml a 20 mcg/ml" incluirá 9 mcg/ml, 10 mcg/ml y similares.

- 30 El término "incluye" o "que incluye" tal como se utiliza en el presente documento se interpretará como no limitante e incorpora los elementos especificados así como elementos no especificados.

El término "interferón" o "IFN" tal como se utiliza en el presente documento significará cualquier interferón presente en la naturaleza o creado artificialmente, que incluya al interferón consenso alfa, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.695.623, titulada "Interferón consenso de leucocito humano", así como al rSIFN-co.

- 35 La expresión "actividad de interferón" tal como se utiliza en el presente documento significará una o más actividades biológicas que caracterizan a un interferón presente en la naturaleza y al rSIFN-co, tales como, por ejemplo, la actividad antitumoral y/o la actividad antiviral.

- 40 El término "rSIFN-co" tal como se utiliza en el presente documento significará la proteína o molécula de ácido nucleico, según lo requiera el contexto, que tenga la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.364.724, n.º 7.585.647 o un fragmento activo del mismo. Dichas secuencia de polinucleótido y secuencia de aminoácidos tal como se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 7.364.724 y n.º 7.585.647 son como sigue:

M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A

1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT

TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P

61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG

GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
 121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
 GTCCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGGCA AGACGTGCTT
 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
 181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
 TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCTGCTT
 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
 241 TCCCTGCTGG AAAAATTCTA CACCGAAGT TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
 AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTGAACG
 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
 301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT
 CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GGCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA
 V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C
 361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC
 CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG
 5
 A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q
 421 GCTTGGAAG TTGTTCTGTC TGAAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG
 CGAACCCTTC AACAAGCACG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC
 E R L R R K E (SEQ ID NO:1)
 481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGAATAA (SEQ ID NO:2)
 CTTGCAGACG CAGCATTTCT TATT (SEQ ID NO:3)

10 La expresión "sustituto de rSIFN-co", tal como se utiliza en el presente documento significará cualquier compuesto, la potencia del cual se ha o se habrá comparado con el rSIFN-co y se puede utilizar en lugar del rSIFN-co a efectos de comparación en la determinación de la potencia o actividad de un compuesto de prueba. El sustituto de rSIFN-co puede ser un interferón o un compuesto que tenga propiedades de interferón.

15 Como se utiliza en el presente documento, la actividad específica es la relación entre la actividad biológica y el contenido de la proteína. La actividad biológica puede ser cualquier actividad biológica relevante convencional en la técnica, tal como la actividad biológica medida mediante el procedimiento de la inhibición de la lesión celular publicada en el Apéndice X C en la farmacopea china (Chinese Pharmacopoeia, el tercer libro), edición de 2010. El contenido de proteína se puede medir a través de cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como el procedimiento de Lowry, publicado en el Apéndice VI B en la farmacopea china (Chinese Pharmacopoeia, el tercer libro), edición de 2010.

20 El término "tratamiento" tal como se utiliza en el presente documento, incluirá que provoca una cura completa o parcial de una enfermedad, detención o inducción de la no progresión de una enfermedad, disminución o reducción de la gravedad de una enfermedad o de los síntomas, prevención de la recurrencia de una enfermedad, reducción de la frecuencia de la recurrencia de una enfermedad, reducción de los efectos secundarios de una enfermedad, remisión de una enfermedad, que provoca una sensación general de una mejoría de salud y similares.

La expresión "receptor relacionado con Wnt o correceptor" incluirá una o más moléculas que individualmente o juntas se unen a una proteína de la familia Wnt para iniciar la señalización en la ruta canónica de señalización Wnt o en la ruta no canónica de señalización Wnt en células. Esta expresión incluye, por ejemplo, LRP6, una proteína 6 relacionada con un receptor de lipoproteína de baja densidad, que se sabe que interactúa con DKK1, un correceptor de Wnt y con FZD6, un receptor para la señalización Wnt y que se considera que es un receptor para el ligando de Wnt-4.

La expresión "actividad de señalización Wnt" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la cascada de señalización Wnt a través de la unión a receptores de la familia Frizzled (FZD) y al correceptor LRP5/IRP6, conduciendo a la liberación de beta-catenina y a su migración al núcleo para la activación celular.

Los presentes inventores han descubierto en el presente documento ciertos efectos biológicos resultantes de la administración o tratamiento con rSIFN-co y estos efectos biológicos se pueden emplear para calcular la potencia del rSIFN-co y otros compuestos que pueden tener propiedades similares, especialmente durante el procedimiento de fabricación en el que es deseable la uniformidad en la potencia o en el procedimiento de desarrollo de un fármaco donde se busca la mejora en la potencia. Los presentes inventores han descubierto adicionalmente ciertos efectos biológicos tras el tratamiento con rSIFN-co, hasta ahora desconocidos y tales efectos biológicos se pueden emplear para usos adicionales del rSIFN-co, incluyendo el tratamiento de otros procesos o enfermedades en las que es deseable la regulación al alza o la regulación a la baja de ciertos genes.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un interferón de prueba con respecto al rSIFN-co que comprende: (1) proporcionar el interferón de prueba y el rSIFN-co; y (2) determinar una o más de las siguientes actividades del interferón de prueba y del rSIFN-co en las mismas condiciones especificadas, respectivamente: (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas; (c) Inhibición de la migración de células cancerosas; (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; (e) Regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas; (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas; por lo cual la presencia en el interferón de prueba de 1, o 2, o 3, o 4, o 5, o 6 de las actividades especificadas en (a), (b), (c), (d), (e) y (f), de forma estadísticamente significativa y/o la presencia en el interferón de prueba de una o más de las actividades especificadas en (g), (h) e (i), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para establecer equivalencia sustancial entre un compuesto de prueba y el rSIFN-co que comprende: (1) proporcionar el interferón de prueba y el rSIFN-co; y (2) determinar una o más de las siguientes actividades del interferón de prueba y del rSIFN-co en las mismas condiciones especificadas, respectivamente: (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas; (c) Inhibición de la migración de células cancerosas; (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; (e) Regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas; (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas; por lo cual la presencia en el interferón de prueba de 1, o 2, o 3, o 4, o 5, o 6 de las actividades especificadas en (a), (b), (c), (d), (e) y (f), de forma estadísticamente significativa y/o la presencia en el interferón de prueba de una o más de las actividades especificadas en (g), (h) e (i), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co son equivalentes sustanciales. Opcionalmente, la existencia de reducción en la viabilidad de células tumorales *in vitro*, tales como en células A549 y/o células SW620, junto con la inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF, tal como en una o más de: células A549, células H1299, células H460 y células HT-29, de forma estadísticamente significativa y opcionalmente, la existencia adicional de señalización JAK/STAT, todo bajo el tratamiento o la administración del interferón de prueba, indican equivalencia sustancial entre el interferón de prueba y el rSIFN-co. Más adicionalmente, la determinación de la viabilidad celular se puede realizar bajo tratamiento de las células apropiadas con el interferón de prueba durante aproximadamente 1 a aproximadamente 6 días a, por ejemplo, aproximadamente 10 mcg/ml. Opcionalmente, la inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF se determina en una o más de las células cancerosas: A549, H1299, H460 o HT-29, por ejemplo, mediante el tratamiento de estas células con aproximadamente 10 mcg/ml del interferón de prueba durante aproximadamente 24 h. Opcionalmente, la señalización JAK/STAT se establece mediante la determinación de la presencia de fosforilación de proteínas STAT, tales como STAT1, STAT2 y/o STAT3, tales como bajo tratamiento de células A549 o células Hela, con aproximadamente 10 mcg/ml del interferón de prueba durante diferentes tiempos, tales como 5, 15, 30, 60, 120 y/o 240 minutos.

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 2 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a) y (b); (a) y (c); (a) y (d); (a) y (e); (a) y (f); (a) y (g); (a) y (h); (a) e (i); (b) y (c); (b) y (d); (b) y (e); (b) y (f); (b) y (g); (b) y (h); (b) e (i); (c) y (d); (c) y (e); (c) y (f); (c) y (g); (c) y (h); (c) e (i); (d) y (e); (d) y (f); (d) y (g); (d) y (h); (d) e (i); (e) y (f); (e) y (g); (e) y (h); (e) e (i); (f) y (g); (f) y (h); (f) e (i); (g) y (h); (g) e (i); (h) e (i).

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 3 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b) y (c); (a), (b) y (d); (a), (b) y (e); (a), (b) y (f); (a), (b) y (g); (a), (b) y (h); (a), (b) e (i); (a), (c) y (d); (a), (c) y (e); (a), (c) y (f); (a), (c) y (g); (a), (c) y (h); (a), (c) e (i); (a), (d) y (e); (a), (d) y (f); (a), (d) y (g); (a), (d) y (h); (a), (d) e (i); (a), (e) y (f); (a), (e) y (g); (a), (e) y (h); (a), (e) e (i); (a), (f) y (g); (a), (f) y (h); (a), (f) e (i); (a), (g) y (h); (a), (g) e (i); (a), (h) e (i); (b), (c) y (d); (b), (c) y (e); (b), (c) y (f); (b), (c) y (g); (b), (c) y (h); (b), (c) e (i); (b), (d) y (e); (b), (d) y (f); (b), (d) y (g); (b), (d) y (h); (b), (d) e (i); (b), (e) y (f); (b), (e) y (g); (b), (e) y (h); (b), (e) e (i); (b), (f) y (g); (b), (f) y (h); (b), (f) e (i); (b), (g) y (h); (b), (g) e (i); (b), (h) e (i); (c), (d) y (e); (c), (d) y (f); (c), (d) y (g); (c), (d) y (h); (c), (d) e (i); (c), (e) y (f); (c), (e) y (g); (c), (e) y (h); (c), (e) e (i); (c), (f) y (g); (c), (f) y (h); (c), (f) e (i); (c), (g) y (h); (c), (g) e (i); (c), (h) e (i); (d), (e) y (f); (d), (e) y (g); (d), (e) y (h); (d), (e) e (i); (d), (f) y (g); (d), (f) y (h); (d), (f) e (i); (d), (g) y (h); (d), (g) e (i); (d), (h) e (i); (e), (f) y (g); (e), (f) y (h); (e), (f) e (i); (e), (g) y (h); (e), (g) e (i); (e), (h) e (i); (f), (g) y (h); (f), (g) e (i); (g), (h) e (i).

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 4 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b), (c) y (d); (a), (b), (c) y (e); (a), (b), (c) y (f); (a), (b), (c) y (g); (a), (b), (c) y (h); (a), (b), (c) e i); (a), (c), (d) y (e); (a), (c), (d) y (f); (a), (c), (d) y (g); (a), (c), (d) y (h); (a), (c), (d) e i); (a), (d), (e) y (f); (a), (d), (e) y (g); (a), (d), (e) y (h); (a), (d), (e) e i); (a), (e), (f) y (g); (a), (e), (f) y (h); (a), (e), (f) e i); (a), (f), (g) y (h); (a), (f), (g) e i); (a), (g), (h) e i); (b), (c), (d) y (e); (b), (c), (d) y (f); (b), (c), (d) y (g); (b), (c), (d) y (h); (b), (c), (d) e i); (b), (d), (e) y (f); (b), (d), (e) y (g); (b), (d), (e) y (h); (b), (d), (e) e i); (b), (e), (f) y (g); (b), (e), (f) y (h); (b), (e), (f) e i); (b), (f), (g) y (h); (b), (f), (g) e i); (b), (g), (h) e i); (c), (d), (e) y (f); (c), (d), (e) y (g); (c), (d), (e) y (h); (c), (d), (e) e i); (c), (d), (f) y (g); (c), (d), (f) y (h); (c), (d), (f) e i); (c), (d), (g) y (h); (c), (d), (g) e i); (c), (d), (h) e i); (c), (e), (f) y (g); (c), (e), (f) y (h); (c), (e), (f) e i); (c), (f), (g) y (h); (c), (f), (g) e i); (c), (g), (h) e i); (d), (e), (f) y (g); (d), (e), (f) y (h); (d), (e), (f) e i); (d), (f), (g) y (h); (d), (f), (g) e i); (d), (g), (h) e i); (e), (f), (g) y (h); (e), (f), (g) e i); (e), (g), (h) e i); (f), (g), (h) e i).

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 5 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b), (c), (d) y (e); (a), (b), (c), (d) y (f); (a), (b), (c), (d) y (g); (a), (b), (c), (d) y (h); (a), (b), (c), (d) e (i); (a), (c), (d), (e) y (f); (a), (c), (d), (e) y (g); (a), (c), (d), (e) y (h); (a), (c), (d), (e) e (i); (a), (d), (e), (f) y (g); (a), (d), (e), (f) y (h); (a), (d), (e), (f) e (i); (a), (e), (f), (g) y (h); (a), (e), (f), (g) e (i); (a), (f), (g), (h) e (i); (b), (c), (d), (e) y (f); (b), (c), (d), (e) y (g); (b), (c), (d), (e) y (h); (b), (c), (d), (e) e (i); (b), (d), (e), (f) y (g); (b), (d), (e), (f) y (h); (b), (d), (e), (f) e (i); (b), (e), (f), (g) y (h); (b), (e), (f), (g) e (i); (b), (f), (g), (h) e (i); (c), (d), (e), (f) y (g); (c), (d), (e), (f) y (h); (c), (d), (e), (f) e (i); (c), (e), (f), (g) y (h); (c), (e), (f), (g) e (i); (c), (f), (g), (h) e (i); (d), (e), (f), (g) y (h); (d), (e), (f), (g) e (i); (d), (f), (g), (h) e (i).

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 6 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b), (c), (d), (e) y (f); (a), (b), (c), (d), (e) y (g); (a), (b), (c), (d), (e) y (h); (a), (b), (c), (d), (e) e (i); (a), (c), (d), (e), (f) y (g); (a), (c), (d), (e), (f) y (h); (a), (c), (d), (e), (f) e (i); (a), (d), (e), (f), (g) y (h); (a), (d), (e), (f), (g) e (i); (a), (e), (f), (g), (h) e (i); (b), (c), (d), (e), (f) y (g); (b), (c), (d), (e), (f) y (h); (b), (c), (d), (e), (f) e (i); (b), (d), (e), (f), (g) y (h); (b), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (e), (f), (g), (h) e (i); (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (c), (e), (f), (g), (h) e (i); (d), (e), (f), (g), (h) e (i).

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan al menos 7 de las actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g); (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (h); (a), (b), (c), (d), (e), (f) e (i); (a), (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (a), (c), (d), (e), (f) e (i); (a), (d), (e), (f), (g) e (i); (a), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (d), (e), (f), (g) e (i); (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i).

[illegible]

En algunas realizaciones, en la etapa (2) de los procedimientos anteriores, se determinan las 9 actividades mencionadas anteriormente del interferón de prueba y del rSIFN-co bajo las mismas condiciones especificadas, tales como (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i).

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en comparación con el control, la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como, $p < 0,05$, opcionalmente, $p < 0,01$, más opcionalmente, $p < 0,005$, más opcionalmente, $p < 0,001$, todavía opcionalmente, $p < 0,0005$, todavía más opcionalmente, $p < 0,0001$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales.

Los modelos animales portadores de tumor empleados para determinar la actividad (a) comprenden ratones, opcionalmente, ratones desnudos, más opcionalmente, ratones BALB/c nu/nu. En algunas realizaciones, los ratones, tales como los ratones BALB/c nu/nu, comprenden ratones de aproximadamente 3 semanas de edad a

aproximadamente 7 semanas de edad, opcionalmente, comprenden ratones de aproximadamente 4 semanas de edad a aproximadamente 6 semanas de edad. En algunas realizaciones, el peso corporal de los ratones, tales como los ratones BALB/cA nu/nu, está en un intervalo de aproximadamente 15±2 g a aproximadamente 30±2 g; opcionalmente, en un intervalo de aproximadamente 19±2 g a aproximadamente 23±2 g.

- 5 En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (a), inhibición del crecimiento de las células cancerosas *in vivo*, comprenden una o más de: células cancerosas hepáticas, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas de colon y células cancerosas pulmonares. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (a) comprenden una o más de: células SMMC-7721, células Hela, células HT-29, células SPC-A4 y células A549; opcionalmente, comprenden una o más de: células HT-29, células SPC-A4 y células A549; más opcionalmente, comprenden células A549.

- 10 En algunas realizaciones, se utiliza suero salino normal o PBS, opcionalmente, suero salino normal como control para determinar la inhibición en la actividad (a). En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg; más opcionalmente, aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 0,10 mg. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co, administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en días alternos. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co, administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra durante aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 6 semanas; opcionalmente, aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 semanas. En algunas realizaciones, el control administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en un intervalo de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,30 ml; opcionalmente, aproximadamente 0,10 ml a aproximadamente 0,20 ml. En algunas realizaciones, el control, administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra en días alternos. En algunas realizaciones, el control, administrado a un modelo de ratón portador de tumor para determinar la actividad (a), se administra durante aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 6 semanas; opcionalmente, aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 semanas. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el control se administra(n) intratumoralmente.

- 30 En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en las que se emplean células SMMC-7721 para determinar la actividad (a), en comparación con el control (tal como el suero salino normal), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,05$ para aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 0,10 mg, opcionalmente, $p < 0,01$ para aproximadamente 0,15 mg), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co se administra(n) en días alternos en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg; más opcionalmente, aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 0,10 mg, durante aproximadamente 3 semanas.

- 40 En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en las que se emplean células Hela para determinar la actividad (a), en comparación con el control (tal como el suero salino normal), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,05$ para aproximadamente 0,15 mg, opcionalmente, $p < 0,01$ para aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 0,10 mg), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co se administra(n) en días alternos en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg; más opcionalmente, aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 0,10 mg, durante aproximadamente 4 semanas.

- 50 En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en las que se emplean células HT-29 para determinar la actividad (a), en comparación con el control (tal como el suero salino normal), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,01$ para aproximadamente 0,10 mg y 0,15 mg, opcionalmente, $p < 0,001$ para aproximadamente 0,05 mg), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son sustancialmente equivalentes. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co se administra(n) en días alternos en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg; más opcionalmente, aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 0,10 mg, durante aproximadamente 4 semanas.

- 55 En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en las que se emplean células SPC-A4 para determinar la actividad (a), en comparación con el control (tal como el suero salino normal), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,01$ para aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,10 mg y aproximadamente 0,15 mg), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co se administra(n) en días alternos en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg; más opcionalmente, aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 0,10 mg, durante aproximadamente 3 semanas.

- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (a), en las que se emplean células A549 para determinar la actividad (a), en comparación con el control (tal como el PBS), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (a) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,0001$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el interferón de prueba y/o el rSIFN-co se administra(n) en días alternos en un intervalo de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,30 mg; opcionalmente, aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,15 mg, más opcionalmente, aproximadamente 0,10 mg, durante al menos aproximadamente 3 semanas.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), reducción de la viabilidad de células cancerosas, cuando el interferón de prueba provoca aproximadamente el 50 % de reducción de viabilidad de las células cancerosas a una concentración en un intervalo entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 25 mcg/ml; opcionalmente, entre aproximadamente 10 mcg/ml y aproximadamente 18 mcg/ml; más opcionalmente, entre aproximadamente 10 mcg/ml y aproximadamente 15 mcg/ml, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), cuando el interferón de prueba provoca la reducción de la viabilidad de células cancerosas a un nivel sustancialmente indetectable a una concentración en un intervalo de al menos 25 mcg/ml; opcionalmente, al menos aproximadamente 50 mcg/ml; más opcionalmente, al menos aproximadamente 75 mcg/ml; más opcionalmente, al menos aproximadamente 100 mcg/ml, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), las concentraciones del interferón de prueba y/o del rSIFN-co o del sustituto de rSIFN-co comprenden concentraciones en un intervalo entre aproximadamente 0,2 mcg/ml y aproximadamente 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, las concentraciones del interferón de prueba y/o del rSIFN-co son al menos dos o más de las siguientes: 0,2 mcg/ml, 0,39 mcg/ml, 0,78 mcg/ml, 1,56 mcg/ml, 3,13 mcg/ml, 6,25 mcg/ml, 12,5 mcg/ml, 25 mcg/ml, 50 mcg/ml y 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), las células cancerosas se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos 1 día; opcionalmente, al menos aproximadamente 2 días.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas; opcionalmente, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) comprenden una o más de: células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721 y células PANC-1; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721 y células PANC-1.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), cuando el interferón de prueba provoca aproximadamente el 50 % de reducción en la viabilidad de una o más de: células SW480, células MDA-MB-231 y células PANC-1 a una concentración en un intervalo de aproximadamente 6,25 mcg/ml a aproximadamente 12,5 mcg/ml, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), cuando el interferón de prueba provoca aproximadamente el 50 % de reducción en la viabilidad de una o más de: células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células Calu-1 y células SMMC-7721 a una concentración en un intervalo de aproximadamente 12,5 mcg/ml a aproximadamente 25 mcg/ml, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), cuando se emplean células A549 y/o células SW620 para determinar la actividad (b), en comparación con el control (tal como el IFN α -2b), la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (b) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,01$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (b) se tratan durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días; opcionalmente, aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (b), la viabilidad de las células cancerosas se determina mediante el procedimiento Am-Azul o el procedimiento MTT.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (c), en comparación con el control, la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (c) de forma estadísticamente significativa (tal como $p < 0,01$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el control es un control sin tratamiento (Señuelo).

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c), inhibición de la migración de células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) comprenden una o más de: células A549 y células SW620. En algunas realizaciones, la inhibición de la migración de células cancerosas en la actividad (c) se determina utilizando el procedimiento Transwell. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (c) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas.

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (d), en comparación con el control, la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (d) de forma estadísticamente significativa (tal como, $p < 0,05$, opcionalmente, $p < 0,01$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el control es un control sin tratamiento (Señuelo).

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d), inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d) comprenden una o más de: células A549, células H1299, células H460, células HT-29 y células SW620; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549, células H1299, células H460 y células SW620. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas en determinar la actividad (d) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (d) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, la actividad transcripcional de la beta-catenina/TCF se determina mediante el uso de un sistema reportero. En algunas realizaciones, el sistema reportero comprende los plásmidos TOPFlash o pSV40-RL.

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (e), en comparación con el control, la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (e) de forma estadísticamente significativa (tal como, $p < 0,005$, opcionalmente, $p < 0,001$, más opcionalmente, $p < 0,0005$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el control es un control sin tratamiento (Señuelo).

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e), regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) comprenden una o más de: células A549, células H460, células SW620 y células HT-29; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549, células SW620 y células HT-29; más opcionalmente, comprenden células HT-29. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (e) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (e) se determina la expresión de LRP6 y/o FZD6 mediante la determinación del nivel de ARNm de LRP6 y/o FZD6. En algunas realizaciones, cuando se determina el nivel de ARNm, se utiliza GAPDH como control.

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (f), en comparación con el control, la presencia en el interferón de prueba de la actividad especificada en (f) de forma estadísticamente significativa (tal como, $p < 0,0005$, opcionalmente, $p < 0,0001$), significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. En algunas realizaciones, el control es un control sin tratamiento (Señuelo).

En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f), inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2, comprenden células cancerosas pulmonares; opcionalmente, comprenden células A549. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (f) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (f) la expresión de Axin2, CD24, Survivina y/o ID2 se establece mediante la determinación de su correspondiente nivel de ARNm. En algunas realizaciones, cuando se determina el nivel de ARNm, se utiliza GAPDH como control.

En algunas realizaciones, para determinar la actividad (f), cuando el interferón de prueba disminuye al menos aproximadamente el 30 %; opcionalmente, al menos aproximadamente el 40 %; más opcionalmente, al menos aproximadamente el 50 %; todavía más opcionalmente, al menos aproximadamente el 60 % la expresión de uno o

más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en las células cancerosas en comparación con el control, se considera que el interferón de prueba y/o el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o equivalencia sustancial.

- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (g), cuando la formación de pseudópodos en células cancerosas se inhibe sustancialmente por el interferón de prueba, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. Para fines del presente documento, "inhibido sustancialmente" significa al menos aproximadamente inhibición del 60 %; opcionalmente, al menos aproximadamente inhibición del 70 %; todavía opcionalmente, al menos aproximadamente inhibición del 80 %; más opcionalmente, al menos aproximadamente inhibición del 90 %; todavía más opcionalmente, al menos aproximadamente inhibición del 95 %.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g), inhibición de la formación de pseudópodos, comprenden células cancerosas pulmonares; opcionalmente, células A549. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 4 días; opcionalmente, al menos aproximadamente 8 días. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (g) se cultivan en Matrigel.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (h), cuando el nivel de beta-catenina en las células cancerosas se ve considerablemente disminuido por el interferón de prueba, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales. Para fines del presente documento, el nivel de beta-catenina en células cancerosas se ve considerablemente disminuido después del tratamiento cuando, por ejemplo, en una transferencia Western, la banda que representa la proteína se hace débil o ausente en comparación con la anterior al tratamiento.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h), inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) comprenden una o más de: células A549 y células SW480. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (h) se determina la inhibición de beta-catenina mediante transferencia Western. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 48 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 72 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (h) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml.
- En algunas realizaciones, para determinar la actividad (i), cuando el interferón de prueba puede regular al alza más eficazmente la expresión de una o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas en comparación con IFN α -2b, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen sustancialmente la misma potencia y/o son equivalentes sustanciales.
- En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i), regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas, comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares y células cancerosas de colon. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) comprenden una o más de: células A549, células H460, células SW620 y células HT-29; opcionalmente, comprenden una o más de: células A549 y células SW620. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 20 horas; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, las células cancerosas empleadas para determinar la actividad (i) se tratan mediante el interferón de prueba y/o el rSIFN-co en un intervalo de aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 20 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, para determinar la actividad (i) la expresión de DKK-3, KLF-4 y/o BATF2 se establece mediante la determinación de su correspondiente nivel de ARNm. En algunas realizaciones, cuando se determina el nivel de ARNm, se utiliza GAPDH como control.
- En algunas realizaciones, la significación estadística quiere decir un valor de p menor que o igual a 0,05, o menor que o igual a 0,01, o menor que o igual a 0,005, o menor que o igual a 0,001, o menor que o igual a 0,0005, o menor que o igual a 0,0001, en comparación con un control.
- En algunas realizaciones, el control no se trata con el interferón de prueba o el rSIFN-co, o se trata con suero salino normal o PBS, o se trata con IFN α -2b, o el control es un control sin tratamiento (Señuelo).
- En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un compuesto, tal como un interferón de prueba, que comprende: (a) proveer una pluralidad de concentraciones del interferón de prueba; (b) determinar una respuesta a la primera dosis del interferón de prueba, utilizando la pluralidad de concentraciones del interferón de prueba, sobre la viabilidad de un primer conjunto de células cancerosas en

condiciones específicas; (c) proveer una pluralidad de concentraciones del rSIFN-co; (d) determinar una respuesta a la segunda dosis del rSIFN-co o del sustituto de rSIFN-co, utilizando la pluralidad de concentraciones del rSIFN-co, sobre la viabilidad de un segundo conjunto de células cancerosas en las mismas condiciones especificadas; y (e) comparar la respuesta a la primera dosis con la respuesta a la segunda dosis. De tal manera, la potencia del compuesto, tal como el interferón de prueba, se determina con respecto al rSIFN-co.

En algunas realizaciones de la invención, el rSIFN-co (SEQ ID NO:1) se elabora como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 7.364.724 (Supercompuesto de interferón recombinante) mediante la expresión del polinucleótido nuevo (SEQ ID NO:2) en una *E. coli* hospedadora, opcionalmente bajo el control del promotor P_{BAD} en una *E. coli* hospedadora. En algunas realizaciones de la invención, el rSIFN-co se puede obtener mediante un procedimiento que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia de polinucleótido mostrada en la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones de la invención, el rSIFN-co tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y está codificado por la misma secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2, por lo cual el interferón tiene actividades inhibitorias incrementadas sobre la expresión del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y del antígeno e de la hepatitis B (HBeAg) del virus de la hepatitis B en comparación con un interferón no codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2, tal como el interferón alfacon-1 (INFERGEN®).

En algunas realizaciones, el rSIFN-co utilizado en los procedimientos del presente documento comprende una actividad específica determinada y la actividad específica puede estar, por ejemplo, en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a aproximadamente 1×10^9 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente $4,4 \times 10^8$ IU/mg a aproximadamente 9×10^8 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 5×10^8 IU/mg a aproximadamente 8×10^8 IU/mg. En algunas realizaciones, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 6×10^8 IU/mg a aproximadamente $7,5 \times 10^8$ IU/mg. Opcionalmente, la actividad específica está en el intervalo entre aproximadamente 4×10^8 IU/mg a 5×10^8 IU/mg.

En algunas realizaciones, en los procedimientos para determinar o comparar la potencia de un compuesto, las concentraciones del interferón de prueba o del rSIFN-co están en un intervalo entre aproximadamente 0,2 mcg/ml y aproximadamente 100 mcg/ml. En algunas realizaciones, las concentraciones del interferón de prueba o del rSIFN-co son al menos dos o más de las siguientes: 0,2 mcg/ml, 0,39 mcg/ml, 0,78 mcg/ml, 1,56 mcg/ml, 3,13 mcg/ml, 6,25 mcg/ml, 12,5 mcg/ml, 25 mcg/ml, 50 mcg/ml y 100 mcg/ml.

En algunas realizaciones, las células utilizadas en los procedimientos en el presente documento para determinar el efecto del rSIFN-co son células cancerosas, ya sean humanas o animales. Las células se tratan con el interferón de prueba o el rSIFN-co durante al menos aproximadamente 24 h, opcionalmente, al menos aproximadamente 48 h y más opcionalmente, al menos aproximadamente 72 h y si no se indica otra cosa, en condiciones de cultivo estándar, en medio completo, a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ 5 %. El medio de cultivo puede ser cualquier medio completo estándar adecuado para cultivar células tumorales, tal como el disponible de la colección celular de Shanghai (Shanghai Cell Collection, Shanghai, República Popular China) y complementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % (Biochrom, Alemania), glutamina 4 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. El IFN alfa-2b se puede obtener de Shanghai Hua-xin High Biotechnology, Inc. (Shanghai, República Popular China) y el rSIFN-co se puede obtener de Sichuan Huiyang Life-Engineering Co., Ltd. (Chengdu, República Popular China).

En algunas realizaciones, la invención proporciona el rSIFN-co que tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las células cancerosas en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 25 mcg/ml, dependiendo del tipo de célula cancerosa. En algunas realizaciones, el rSIFN-co tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las células en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 6,25 mcg/ml y aproximadamente 12,5 mcg/ml. En otra realización, el rSIFN-co tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las células en un 50 % a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente 12,5 mcg/ml y 25 mcg/ml. En algunas realizaciones, el IC₅₀ del rSIFN-co está en el intervalo de aproximadamente 10 mcg/ml a aproximadamente 18 mcg/ml.

En algunas realizaciones, el interferón de prueba es también un interferón, pero se obtiene de un lote de fabricación diferente del rSIFN-co utilizado en la comparación.

Por tanto, por ejemplo, para determinar la potencia de un compuesto tal como un interferón de prueba, el interferón de prueba se diluye en varias concentraciones y un cierto número de células preparadas apropiadas para el envase a utilizar, tal como 5×10^3 células en 100 microlitros de medio completo, se incuban durante un cierto periodo de tiempo con dichas concentraciones varias del interferón de prueba, tal como 48 h. Después de la incubación, la viabilidad de las células se determina y compara con la viabilidad de células tratadas análogamente pero con el rSIFN-co en lugar del interferón de prueba. Las curvas de respuesta a la dosis para las células tratadas con el interferón de prueba tratada y con el rSIFN-co se pueden generar a partir de los resultados y compararse. De tal manera, la potencia del interferón de prueba, en términos de dosis eficaz al 50 % o IC₅₀ se puede determinar con respecto a la del rSIFN-co.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar o comparar la potencia de un compuesto, tal como un interferón de prueba, con respecto al rSIFN-co o al sustituto de rSIFN-co, sobre la viabilidad de células cancerosas, que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de células cancerosas; (b) probar un primer

grupo de las células cancerosas con una cantidad del interferón de prueba en condiciones especificadas para generar un primer conjunto de datos de viabilidad; (c) tratar un segundo conjunto de células cancerosas con una cantidad eficaz del rSIFN-co o del sustituto de rSIFN-co en las mismas condiciones especificadas para generar un segundo conjunto de datos de viabilidad; y (d) comparar el primer conjunto de datos de viabilidad con el segundo conjunto de datos de viabilidad, por lo cual se determina la potencia del interferón de prueba.

En algunas realizaciones, las células cancerosas se tratan durante un intervalo desde aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 días. En algunas realizaciones, el rSIFN-co se utiliza a una concentración en el intervalo de aproximadamente 6,25 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 7 mcg/ml a aproximadamente 25 mcg/ml; más opcionalmente, aproximadamente 8 mcg/ml a aproximadamente 12,5 mcg/ml; todavía opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml. En algunas realizaciones, el rSIFN-co comprende una actividad específica determinada.

En algunas realizaciones, las células cancerosas utilizadas en el presente documento se eligen de entre células tumorales humanas y células tumorales animales. En algunas realizaciones, las células tumorales son células tumorales pulmonares o células tumorales cervicouterinas o células tumorales hepáticas o células tumorales de colon o células tumorales mamarias o células tumorales pancreáticas o células tumorales prostáticas o células tumorales inducidas por virus o células transformadas viralmente. En algunas realizaciones, las células cancerosas se eligen de al menos una de: células A549, células Calu-1, células CL-1, H460, H1299, células Hela, HT29, células Huh-7, células MDA-MB-231, PANC-1, RAW264.7, células SMMC-7721, células SW480 y células SW620.

Por tanto, por ejemplo, un cierto número de células cancerosas en un volumen apropiado para el envase de prueba, tal como 2×10^3 células en 100 microlitros de medio completo, se pueden depositar en placas de 96 pocillos y tratarse con aproximadamente 10 mcg/ml del interferón de prueba o con rSIFN-co o dejarse sin tratar como control, durante 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días y determinar la viabilidad de las células tratadas por día con respecto a la viabilidad del control sin tratamiento. Al final del experimento, se puede representar gráficamente la viabilidad de las células tratadas respecto a las del control sin tratamiento frente al número de días del tratamiento de interferón. De esta forma, la capacidad del compuesto de prueba para reducir la viabilidad de las células cancerosas se puede comparar y determinar su potencia con respecto a la del rSIFN-co.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la migración celular, tal como ocurre en la metástasis tumoral, que comprende la exposición de las células cancerosas a una cantidad eficaz de rSIFN-co, durante un período de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la migración celular.

En algunas realizaciones, la exposición de las células, tales como las células tumorales, al rSIFN-co como se menciona en el presente documento se puede efectuar *in vitro* o *in vivo*, mediante la incubación de las células en la presencia de una cantidad eficaz de rSIFN-co a 37 °C durante un periodo de tiempo, tal como durante 24 h, o mediante la administración de una cantidad eficaz del rSIFN-co a animales o sujetos, de manera que una cierta concentración del rSIFN-co se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para obtener el efecto deseado, tal como la inhibición de la migración de células tumorales como en la metástasis o la inhibición de la formación de pseudópodos, inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF, inhibición de la expresión de la proteína beta-catenina, regulación a la baja de los receptores relacionados con Wnt y/o correceptores, regulación a la baja de genes diana corriente abajo de señalización Wnt, regulación al alza de genes supresores de tumores y otros como se describe en el presente documento.

El ensayo de migración celular se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de los kits comercialmente disponibles. Por ejemplo, en el presente documento se puede utilizar un inserto de 8 micrómetros que contiene una membrana de microporos situado en una placa de 24 pocillos de Becton-Dickinson Biosciences (Nueva Jersey, Estados Unidos de América). Para el ensayo, se puede añadir medio de cultivo basado en bicarbonato tibio a 37 °C sin SBF al interior de los insertos y al fondo de los pocillos y permitir la rehidratación durante aproximadamente 2 h en un incubador de cultivo tisular humidificado a 37 °C, en atmósfera de CO₂ 5 %. Después de la rehidratación, el medio se puede eliminar cuidadosamente y aproximadamente 500 microlitros de las células preparadas (tales como las células pretratadas con rSIFN-co durante 24 h a 37 °C), suspendidas en medio libre de SBF, pueden sembrarse sobre las caras superiores de los filtros de los insertos a una densidad de aproximadamente $0,5 \times 10^4$ células/inserto. Después se pueden añadir 500 microlitros de medio completo con SBF 10 % al compartimento más bajo de las placas de 24 pocillos. Las células/insertos/placa se pueden entonces incubar a 37 °C durante aproximadamente 24 h y las células no migradas sobre la cara superior de las membranas de las cámaras pueden eliminarse, tal como con un hisopo de algodón. Las superficies inferiores de los insertos de cultivo que contienen las células migradas se pueden fijar, como ejemplo con paraformaldehído 4 % y teñir con cloruro de metilosanilina 2 %. Se puede contar el número de células migradas sobre la cara opuesta de las membranas de las cámaras y determinar el número medio de células que migran por campo. De esta forma, la capacidad del interferón de prueba para inhibir la migración de células tumorales se puede demostrar.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de rSIFN-co comprende aproximadamente 5 mcg/ml a aproximadamente 100 mcg/ml; opcionalmente, aproximadamente 8 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml; todavía opcionalmente, aproximadamente 10 mcg/ml a aproximadamente 25 mcg/ml; más opcionalmente, aproximadamente 12 mcg/ml a aproximadamente 18 mcg/ml.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de formación de pseudópodos en células cancerosas, que comprende la exposición de células cancerosas a una cantidad eficaz de rSIFN-co, durante un período de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la formación de pseudópodos.

- 5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF en células, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado.

En algunas realizaciones, la actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF se determina empleando un sistema reportero de luciferasa. En algunas realizaciones, el sistema reportero es el reportero TOPFlash. En algunas realizaciones, se utiliza el plásmido pSV40-RL. Por tanto, por ejemplo, las células a evaluar se pueden sembrar en placas de 96 pocillos, tal como a aproximadamente 1×10^4 células por pocillo e incubarse durante aproximadamente 12 h a 37 °C, después de lo cual, se transfectan transitoriamente con aproximadamente 100 ng de TOPFlash (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América). Para la normalización de la eficacia de transfección, las células se pueden cotransfectar adicionalmente con 1 ng de reportero de control interno luciferasa de Renilla reniformis dirigido con el promotor de SV40 (pRL-SV40) (Promega, Madison, Wisconsin). Después de 6 h de transfección, las células para el análisis *in vitro* se pueden entonces tratar con rSIFN-co durante aproximadamente 24 h. Después del tratamiento de rSIFN-co para el análisis *in vitro* o después de la transfección para el análisis *in vivo*, el ensayo de luciferasa puede realizarse utilizando el kit de ensayo de sistema de luciferasa dual (Dual Luciferase Assay System) de acuerdo con los protocolos del fabricante (N.º de catálogo: E1960, Promega). Se puede determinar la actividad de luciferasa relativa como una proporción de la actividad de luciferasa luciérnaga/renilla.

- 20 En otro aspecto, la invención adicionalmente proporciona un procedimiento para disminuir el nivel de proteína beta-catenina en células que comprende la exposición de células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado. En algunas realizaciones, el nivel de proteína de beta-catenina se detecta mediante transferencia Western utilizando su anticuerpo específico. En algunas realizaciones, se utiliza GAPDH como control.

En el análisis de transferencia Western, para determinar el nivel de beta-catenina en las células, célula de cultivo *in vitro* o de muestras de tumor *in vivo*, se pueden emplear procedimientos estándar. Por ejemplo, las proteínas celulares totales se pueden extraer utilizando agentes de extracción (N.º de catálogo: P0013) siguiendo el protocolo del fabricante (Beyotime, República Popular China). Las concentraciones de proteínas se pueden determinar con el sistema de ensayo de proteína de Lowry de Bio-Rad. Las proteínas totales se pueden separar mediante SDS-PAGE en gel al 10 % - 12 % y después transferirse a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América). La membrana se puede bloquear con tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino 5 %, Tris-HCl 10 mmol/l, pH 8,0, NaCl 150 mol/l y Tween 20 0,05 %) durante la noche a 4 °C, y después incubarse con anticuerpos primarios (dilución 1:1000) seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Los anticuerpos pueden ser de cualquier proveedor, por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos: anti-beta-catenina monoclonal de ratón (1:1000, Santa Cruz Technology, Santa Cruz, California), anti-GAPDH monoclonal de ratón (1:2000, Kangwei Biotechnology, República Popular China) y anticuerpo secundario conjugado con HRP de antirratón (1:2000, Santa Cruz Technology). Las manchas se pueden visualizar utilizando el sistema Luminescence/Fluorescence Imaging LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos de América) con el kit de sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Estados Unidos de América).

- 40 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para regular a la baja la expresión de un receptor relacionado con Wnt o correceptor en células, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co por un tiempo especificado, por lo cual el receptor relacionado con Wnt o correceptor es regulado a la baja. En algunas realizaciones, el receptor relacionado con Wnt o correceptor comprende una proteína LRP, tal como la LRP6. En algunas realizaciones, el receptor relacionado con Wnt o correceptor comprende una proteína FZD, tal como la FZD6. Como se ha indicado anteriormente, el procedimiento de exposición de las células al rSIFN-co puede ser un procedimiento *in vitro* o un procedimiento *in vivo*.

En algunas realizaciones, la determinación de la expresión del receptor relacionado con Wnt o del correceptor comprende determinar el nivel de ARNm de tal receptor o correceptor. Tal nivel de ARNm se puede determinar mediante procedimientos estándar. En algunas realizaciones, se elabora ADNc correspondiente a dicho ARNm para determinar dichos niveles de ARNm. Por ejemplo, el ARNm total se puede aislar utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se puede sintetizar ADN complementario utilizando el kit de RT-PCR (N.º de catálogo: FSQ-101, TOYOBO, Japón) según las instrucciones del fabricante y después sometido a PCR cuantitativa (qPCR) con un kit de PCR SYBR Green (N.º de catálogo: QPK-201, TOYOBO, Japón). Se pueden utilizar cebadores adecuados. Por ejemplo, los cebadores para LRP6 pueden ser cebadores sentido: 5'-TGAAGAACCAGCACACAGG-3' (SEQ ID NO:4); cebadores antisentido: 5'-CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3' (SEQ ID NO:5) y los cebadores para FZD6 pueden ser cebadores sentido: 5'-GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3' (SEQ ID NO:6); y cebadores antisentido: 5'-TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC-3' (SEQ ID NO:7). El protocolo de amplificación puede ser de incubaciones a 95 °C durante 1 minuto, 40 ciclos (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos). La incorporación del colorante SYBR Green en los productos de PCR se pueden monitorizar en tiempo real con un sistema de detección Bio-Rad y después analizados utilizando el software Bio-Rad CFX manager 2.1. Las muestras se pueden agrupar para cada proceso y ejecutarlas por duplicado. Las muestras tratadas con interferón se

pueden comparar con las muestras sin tratar Señuelo utilizando el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y representar gráficamente como factor de cambio. Se puede utilizar GAPDH como un control de normalización. Este procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se utiliza convencionalmente para analizar cambios relativos en la expresión génica de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de regulación a la baja de la expresión de ciertos genes en células, que incluye al menos un gen diana de la ruta de señalización Wnt, tal como en el tratamiento de una enfermedad o proceso en el que el gen diana muta o está sobreactivado. Dichos genes regulados a la baja incluyen, por ejemplo, uno o más de Axin2, CD24, Survivina y/o ID2. El procedimiento comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado, por lo cual se inhibe la expresión del gen diana. La extensión de la regulación a la baja puede determinarse mediante técnicas estándar tales como qPCR como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, para tal qPCR, para Axin2, los cebadores sentido: 5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3' (SEQ ID NO:8) y los cebadores antisentido: 5'-GCTGTTGTTCTCAATGTA-3' (SEQ ID NO:9) se pueden utilizar; para CD24, los cebadores sentido: 5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3' (SEQ ID NO:10) y los cebadores antisentido: 5'-GAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3' (SEQ ID NO:11) se pueden utilizar; para Survivina, los cebadores sentido: 5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3' (SEQ ID NO:12) y los cebadores antisentido: -5'-CAAGTCTGGCTCGTTC-3' (SEQ ID NO:13) se pueden utilizar; y para ID2, los cebadores sentido: 5'-CACAACAACAACAAC-3' (SEQ ID NO:14) y los cebadores antisentido: 5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3' (SEQ ID NO:15) se pueden utilizar.

20 En algunas realizaciones de la invención, el periodo de tiempo especificado para la exposición de las células al rSIFN-co es al menos de aproximadamente 12 h; opcionalmente, al menos aproximadamente 24 h; más opcionalmente, durante al menos aproximadamente 36 h; todavía opcionalmente, al menos durante aproximadamente 48 h; pero todavía opcionalmente, al menos aproximadamente 72 h. En algunas realizaciones, las células que se tratan mediante rSIFN-co son células cancerosas.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de regulación al alza de la expresión de ciertos genes en células, que incluye al menos un gen supresor de tumor, que comprende la exposición de las células a una cantidad eficaz de rSIFN-co durante un periodo de tiempo especificado, por lo cual la regulación al alza de la expresión al menos un gen supresor de tumor se efectúa. En algunas realizaciones, el gen regulado al alza comprende al menos uno de DKK3, KLF4 y BATF2. La extensión de la regulación al alza de tales genes puede determinarse mediante técnicas convencionales. En algunas realizaciones, la expresión del gen regulado al alza se determina midiendo dicho nivel de ARNm. En algunas realizaciones, el ADNc se sintetiza de dicho ARNm y se amplifica opcionalmente para dichos fines de medición. Como ejemplo, para fines de amplificación, se pueden usar los siguientes cebadores: para BATF2, los cebadores sentido: 5'-CAGAGCAGGGAGCACAAACC-3' (SEQ ID NO:16) y los cebadores antisentido: 5'-TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG -3' (SEQ ID NO:17); para DKK3, los cebadores sentido: 5'-GGAGCCTGACTGAAGAGATGG-3' (SEQ ID NO:18) y los cebadores antisentido: 5'-ACGCCTAAAGCACACACCTG-3' (SEQ ID NO:19); para KLF4, los cebadores sentido: 5'-CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO:20) y los cebadores antisentido: 5'-GGCTGCTGCGGCGGAATG-3' (SEQ ID NO:21).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para establecer equivalencia sustancial entre un compuesto de prueba y el rSIFN-co en al menos uno, opcionalmente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los siguientes, que comprende comparar las actividades de los mismos y mostrar sustancialmente las mismas respuestas: (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores; (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas; (c) Inhibición de la migración de células cancerosas; (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas; (e) Regulación a la baja de la expresión de LRP6 y/o FZD6 en células cancerosas; (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas; (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas; (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas. En algunas realizaciones, la invención proporciona el establecimiento de equivalencia sustancial en al menos 2 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a) y (b); (a) y (c); (a) y (d); (a) y (e); (a) y (f); (a) y (g); (a) y (h); (a) e (i); (b) y (c); (b) y (d); (b) y (e); (b) y (f); (b) y (g); (b) y (h); (b) e (i); (c) y (d); (c) y (e); (c) y (f); (c) y (g); (c) y (h); (c) e (i); (d) y (e); (d) y (f); (d) y (g); (d) e (i); (e) y (f); (e) y (g); (e) y (h); (e) e (i); (f) y (g); (f) y (h); (f) e (i); (g) y (h); (g) e (i); (h) e (i); opcionalmente, la invención proporciona el establecimiento de equivalencia sustancial en al menos 3 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b) y (c); (a), (b) y (d); (a), (b) y (e); (a), (b) y (f); (a), (b) y (g); (a), (b) y (h); (a), (b) e (i); (a), (c) y (d); (a), (c) y (e); (a), (c) y (f); (a), (c) y (g); (a), (c) y (h); (a), (c) e (i); (a), (d) y (e); (a), (d) y (f); (a), (d) y (g); (a), (d) y (h); (a), (d) e (i); (a), (e) y (f); (a), (e) y (g); (a), (e) y (h); (a), (e) e (i); (a), (f) y (g); (a), (f) y (h); (a), (f) e (i); (a), (g) y (h); (a), (g) e (i); (a), (h) e (i); (b), (c) y (d); (b), (c) y (e); (b), (c) y (f); (b), (c) y (g); (b), (c) y (h); (b), (c) e (i); (b), (d) y (e); (b), (d) y (f); (b), (d) y (g); (b), (d) y (h); (b), (d) e (i); (b), (e) y (f); (b), (e) y (g); (b), (e) y (h); (b), (e) e (i); (b), (f) y (g); (b), (f) y (h); (b), (f) e (i); (b), (g) y (h); (b), (g) e (i); (b), (h) e (i); (c), (d) y (e); (c), (d) y (f); (c), (d) y (g); (c), (d) y (h); (c), (d) e (i); (c), (e) y (f); (c), (e) y (g); (c), (e) y (h); (c), (e) e (i); (c), (f) y (g); (c), (f) y (h); (c), (f) e (i); (c), (g) y (h); (c), (g) e (i); (c), (h) e (i); (d), (e) y (f); (d), (e) y (g); (d), (e) y (h); (d), (e) e (i); (d), (f) y (g); (d), (f) y (h); (d), (f) e (i); (d), (g) y (h); (d), (g) e (i); (d), (h) e (i); (e), (f) y (g); (e), (f) y (h); (e), (f) e (i); (e), (g) y (h); (e), (g) e (i); (e), (h) e (i); (f), (g) y (h); (f), (g) e (i); (g), (h) e (i); opcionalmente, en al menos 4 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c) y (d); (a), (b), (c) y (e); (a), (b), (c) y (f); (a), (b), (c) y (g); (a), (b), (c) y (h); (a), (b), (c) e (i); (a), (c), (d) y (e); (a), (c), (d) y (f); (a), (c), (d) y (g); (a), (c), (d) y (h); (a), (c), (d) e (i); (a), (d), (e) y (f); (a), (d), (e) y (g); (a), (d), (e) y (h); (a), (d), (e) e (i); (a), (e), (f)

y (g); (a), (e), (f) y (h); (a), (e), (f) e (i); (a), (f), (g) y (h); (a), (f), (g) e (i); (a), (g), (h) e (i); (b), (c), (d) y (e); (b), (c), (d) y (f); (b), (c), (d) y (g); (b), (c), (d) y (h); (b), (c), (d) e (i); (b), (d), (e) y (f); (b), (d), (e) y (g); (b), (d), (e) y (h); (b), (d), (e) e (i); (b), (e), (f) y (g); (b), (e), (f) y (h); (b), (e), (f) e (i); (b), (f), (g) y (h); (b), (f), (g) e (i); (b), (g), (h) e (i); (c), (d), (e) y (f); (c), (d), (e) y (g); (c), (d), (e) y (h); (c), (d), (e) e (i); (c), (d), (f) y (g); (c), (d), (f) y (h); (c), (d), (f) e (i); (c), (d), (g) y (h); (c), (d), (g) e (i); (c), (d), (h) e (i); (c), (e), (f) y (g); (c), (e), (f) y (h); (c), (e), (f) e (i); (c), (f), (g) y (h); (c), (f), (g) e (i); (c), (g), (h) e (i); (d), (e), (f) y (g); (d), (e), (f) y (h); (d), (e), (f) e (i); (d), (f), (g) y (h); (d), (f), (g) e (i); (d), (g), (h) e (i); (e), (f), (g) y (h); (e), (f), (g) e (i); (e), (g), (h) e (i); (f), (g), (h) e (i); todavía opcionalmente, en al menos 5 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c), (d) y (e); (a), (b), (c), (d) y (f); (a), (b), (c), (d) y (g); (a), (b), (c), (d) y (h); (a), (b), (c), (d) e (i); (a), (c), (d), (e) y (f); (a), (c), (d), (e) y (g); (a), (c), (d), (e) y (h); (a), (c), (d), (e) e (i); (a), (d), (e), (f) y (g); (a), (d), (e), (f) y (h); (a), (d), (e), (f) e (i); (a), (e), (f), (g) y (h); (a), (e), (f), (g) e (i); (a), (f), (g), (h) e (i); (b), (c), (d), (e) y (f); (b), (c), (d), (e) y (g); (b), (c), (d), (e) y (h); (b), (c), (d), (e) e (i); (b), (d), (e), (f) y (g); (b), (d), (e), (f) y (h); (b), (d), (e), (f) e (i); (b), (e), (f), (g) y (h); (b), (e), (f), (g) e (i); (b), (f), (g), (h) e (i); (c), (d), (e), (f) y (g); (c), (d), (e), (f) y (h); (c), (d), (e), (f) e (i); (c), (e), (f), (g) y (h); (c), (e), (f), (g) e (i); (c), (f), (g), (h) e (i); (d), (e), (f), (g) y (h); (d), (e), (f), (g) e (i); (d), (f), (g), (h) e (i); más opcionalmente, en al menos 6 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c), (d), (e) y (f); (a), (b), (c), (d), (e) y (g); (a), (b), (c), (d), (e) y (h); (a), (b), (c), (d), (e) e (i); (a), (c), (d), (e), (f) y (g); (a), (c), (d), (e), (f) y (h); (a), (c), (d), (e), (f) e (i); (a), (d), (e), (f), (g) y (h); (a), (d), (e), (f), (g) e (i); (a), (e), (f), (g), (h) e (i); (b), (c), (d), (e), (f) y (g); (b), (c), (d), (e), (f) y (h); (b), (c), (d), (e), (f) e (i); (b), (d), (e), (f), (g) y (h); (b), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (e), (f), (g), (h) e (i); (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (c), (e), (f), (g), (h) e (i); (d), (e), (f), (g), (h) e (i); todavía más opcionalmente, en al menos 7 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g); (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (h); (a), (b), (c), (d), (e), (f) e (i); (a), (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (a), (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i); (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (d), (e), (f), (g) y (h); (b), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (e), (f), (g), (h) e (i); (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (c), (e), (f), (g), (h) e (i); (d), (e), (f), (g), (h) e (i); todavía más opcionalmente, en al menos 8 de las actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h); (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (i); (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i); (a), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i); (a), (b), (d), (e), (f), (g), (h) e (i); (a), (b), (c), (e), (f), (g), (h) e (i); (a), (b), (c), (d), (f), (g), (h) e (i); (a), (b), (c), (d), (e), (g), (h) e (i); (a), (b), (c), (d), (e), (f), (h) e (i); (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (i); u opcionalmente, las 9 actividades mencionadas anteriormente, tales como (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i).

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits de ensayo que comprenden (a) el rSIFN-co o el sustituto de rSIFN-co y (b) al menos uno de: instrucciones para realizar uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento y reactivos para llevar a cabo dichos procedimientos. El reactivo puede incluir tampón fosfato salino (PBS) o un tampón. En algunas realizaciones, el rSIFN-co en el kit de ensayo comprende una actividad específica determinada.

En algunas realizaciones, el interferón de prueba también señala a través de la ruta de señalización JAK/STAT en células cancerosas y/o comparte el receptor IFNAR1/2 común con rSIFN-co y es, por lo tanto, un equivalente sustancial de rSIFN-co o tiene sustancialmente la misma potencia que el rSIFN-co. En algunas realizaciones la señalización a través de la ruta JAK/STAT se determina mediante la detección de la presencia de proteínas fosforiladas de la familia STAT, tales como STAT1, STAT2 y/o STAT3. En algunas realizaciones, se utilizan transferencias Western para tal detección. En algunas realizaciones, se pueden utilizar células cancerosas A549 y/o células Hela para tal detección. En algunas realizaciones, las células cancerosas se tratan con aproximadamente 10 mcg/ml del interferón de prueba o el rSIFN-co. En algunas realizaciones las células cancerosas se tratan con el interferón de prueba o el rSIFN-co durante aproximadamente 5, 15, 30, 60, 120, y/o 240 minutos. En algunas realizaciones, después del tratamiento con el interferón, se recogen las proteínas celulares para el análisis de transferencia Western. En algunas realizaciones, se utiliza GAPDH como control.

En algunas realizaciones, las pruebas o análisis a realizar para establecer equivalencia o potencia para el rSIFN-co se pueden realizar de forma convencional y no se limitan a la manera desvelada en el presente documento.

Ejemplos

La invención del presente documento se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, pero no se pretende que los ejemplos limiten el ámbito de la invención. Otros objetos, características y ventajas de lo expuesto de la invención se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia y de la descripción detallada y ejemplos y reivindicaciones adjuntas, junto con los dibujos adjuntos.

Todos los datos se muestran como medias $\pm$ desviación estándar (SD). Se aplicaron Pruebas t (y test no paramétricos) para analizar la relación entre las diferentes variables. La significación estadística se estableció cuando $p < 0,05$.

Ejemplo 1. Actividad del rSIFN-co sobre hepatoma humano.

Este estudio se realizó para demostrar la actividad y la eficacia del rSIFN-co sobre el hepatoma humano, utilizando el hepatoma humano SMMC-7721 como modelo, en un sistema *in vivo*. La actividad del artículo de prueba, el rSIFN-co, se comparó con la de la Mitomicina C ("MMC"). El rSIFN-co, un líquido incoloro, a una concentración de 1 mg/ml, se consiguió a través de Huiyang Life Science and Technology Corp. (Chengdu, República Popular China). El artículo de prueba se utilizó sin dilución. Se almacenó a 4 °C hasta su descongelación para inyectarlo. La Mitomicina C ("MMC"), n.º de lote 505 AGB, a una concentración de 2 mg/vial, se consiguió a través de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Japón).

La MMC se diluyó con suero salino normal en el momento de la inyección.

Los experimentos con animales se operaron según los Institutos Nacionales de guía de salud para el cuidado y utilización de animales de laboratorio (del inglés, National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

5 Los animales empleados fueron ratones de 4 - 6 semanas de edad, machos adultos BALB/cA nu/nu, con un peso de aproximadamente 23 ± 2 g, conseguidos del Shanghai Institute of Materia Medica (Shanghai, República Popular China). El protocolo del estudio se revisó por el Comité de la utilización y cuidado de animales (del inglés, Committee on the Use and Care of Animals) del Shanghai Institute of Materia Medica para el cumplimiento de la normativa y se obtuvo la aprobación del Comité antes del inicio del estudio. En lo posible, los procedimientos utilizados en este estudio se diseñaron para evitar o minimizar cualquier molestia, angustia y dolor a los animales. Los animales que experimentan dolor severo o crónico o molestias que no pudieron ser aliviados se sacrificaron sin dolor, de acuerdo a la normativa. Los animales se encerraron en jaulas, en grupos de 6. Se les marcó las orejas, mediante la identificación por perforación de oreja. Se mantuvo la temperatura ambiente a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La luz se encendía a las 12 h y se apagaba a las 12 h. La comida se proporcionó *ad libitum*. El agua del grifo, filtrada con un filtro de 5 micrómetros (μm), se proporcionó a los animales mediante frascos de agua *ad libitum*. El director del estudio no tuvo constancia, ni Huiyang Life Science and Technology Corp., de ningún contaminante en la comida o el agua que pudiera haber interferido o influido en la intención o el fin de este estudio.

El artículo de prueba (rSIFN-co) y el control de vehículo se administraron intratumoralmente (i.t.). El artículo de prueba se administró en un volumen de 0,05 ml - 0,15 ml por ratón por tratamiento, dependiendo del grupo de asignación del animal. La MMC se administró por vía intravenosa (i.v.) a 10 microlitros (μl)/g. Se inyectó suero salino normal en un volumen de 0,15 ml por ratón, el cual se utilizó como control de vehículo.

Los grupos de tratamiento se asignaron aleatoriamente a los animales. Inicialmente, todos los animales se colocaron en una jaula de grandes dimensiones. Para la asignación del estudio, posteriormente se les encerró por separado, con 6 animales por jaula por grupo de tratamiento. La dosis y pauta posológica para cada grupo se hizo como se expone en la Tabla 1. Los Grupos 1 y 2 son grupos de control en los que a los animales se les administró el vehículo en días alternos después del primer tratamiento. A los animales del Grupo 3 se les administró MMC una dosis de 5 mg/kg los días 1 y 6 después del inicio del tratamiento. A los animales de los Grupos 4, 5 y 6 se les administró rSIFN-co en días alternos después del primer tratamiento, a 0,15 mg/ratón (Grupo 4) o 0,10 mg/ratón (Grupo 5) o 0,05 mg/ratón (Grupo 6), respectivamente. El crecimiento tumoral se monitorizó midiendo la longitud y la anchura de cada tumor dos veces por semana durante el transcurso del estudio. Se pesó a cada animal dos veces por semana durante el transcurso del estudio.

Los tumores, xenoinjertos de hepatoma humano SMMC-7721, se establecieron en cada animal mediante la inoculación de 5×10^6 células subcutáneamente (s.c.) en cada ratón. Antes del comienzo de este estudio, se hicieron dos pases de los xenoinjertos en ratones desnudos. En condiciones de esterilidad, los tumores bien desarrollados se cortaron en fragmentos de $1,5 \text{ mm}^3$ y uno de tales fragmentos se inyectó con aguja trocar en el flanco derecho de cada animal de estudio. Cuando los tumores alcanzaron un volumen en el intervalo de 100 mm^3 - 200 mm^3 , los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos control y de tratamiento y cada grupo recibió vehículo (Grupos 1 y 2), rSIFN-co (Grupos 4, 5 y 6) o MMC (Grupo 3) a las dosis y con arreglo a la pauta establecida en la Tabla 1, durante un periodo de 3 semanas. El tamaño del tumor individual (longitud y anchura) se midió dos veces por semana con microcalibres. El volumen del tumor (V) se calculó con la fórmula: $V = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$. El volumen del tumor relativo individual (VTR) se calculó con la fórmula: $VTR = V_t / V_0$, en la que V_t es el volumen del tumor el día de la medición y V_0 es el volumen el día del primer tratamiento. El efecto terapéutico del artículo de prueba o del artículo control se expresa en términos de T/C (%), utilizando la siguiente fórmula: $T/C (\%) = (VTR \text{ medio del grupo tratado} / VTR \text{ del grupo control}) \times 100 \%$; y en términos del % de inhibición, utilizando la siguiente fórmula: $\% \text{ Inhibición} = 100 \% - T/C\%$.

Tabla 1. Niveles de dosis e Identificación de Grupo para el Ejemplo 1.

Grupo	n	Tratamiento	Dosis	Pauta de dosificación
1	6	Vehículo	ND	Días alternos
2	6	Vehículo	ND	Días alternos
3	6	MMC	5 mg/kg	d1 y d16
4	6	rSIFN-co	0,15 mg/ratón	Días alternos
5	6	rSIFN-co	0,10 mg/ratón	Días alternos
6	6	rSIFN-co	0,05 mg/ratón	Días alternos

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la FIG. 1. La Tabla 2 muestra, para cada grupo de tratamiento, el tamaño inicial del tumor en el día 0, el tamaño final del tumor en el día 21, así como el VTR medio calculado, T/C (%) y % de Inhibición.

Tabla 2. Actividad del rSIFN-co sobre hepatoma humano SMMC-7721

Tratamiento	VT(mm ³ , media±SD) (D0)	VT(mm ³ , media±SD) (D21)	VTR (media±SD)	T/C (%)	% Inhibición	Valor de p
suero salino normal (12 ratones)	129±26	1172±302	9,36±3,9			
MMC	125±35	621 ±247	5,05±2,1*	52,82	47,18	p<0,05
0,15 mg rSIFN -co	123±20	505±226	4,13±1,9**	43,20	56,80	p<0,01
0,10 mg rSIFN -co	124±15	573±287	4,57±2,3*	47,80	52,20	p<0,05
0,05 mg rSIFN -co	124±26	592±139	4,97±1,7*	51,99	48,01	p<0,05

La Tabla 2 muestra que el rSIFN-co resultó activo y eficaz en la inhibición del crecimiento de células de hepatoma humano en las 3 dosis probadas. El VTR medio el día 21 (D21) fue 9,36 ± 3,9 para el grupo de Control de Vehículo, 5,05 ± 2,1 para el grupo tratado con MMC, 4,13 ± 1,9 para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, 4,57 ± 2,3 para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y 4,97 ± 1,7 para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co. El % de Inhibición el día 21 (D21) fue: 47,18 % para el grupo tratado con MMC, 56,80 % para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, 52,20 % para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y 48,01 % para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co. Las diferencias en VTR entre cada grupo de tratamiento y el grupo de Control de Vehículo resultaron estadísticamente significativas.

La FIG. 1 muestra la progresión del crecimiento del hepatoma humano, SMMC-7721, en ratones desnudos, como se representa por el VTR, para cada grupo de tratamiento durante el periodo de estudio de 21 días, reflejando las mediciones del tumor hechas los días 3, 7, 10, 14, 17 y 21 después del inicio del tratamiento. Los resultados muestran retardo en el crecimiento tumoral en cada uno de los grupos tratados con MMC y con rSIFN-co el día 7, que se mantuvo hasta el día 21. Los resultados muestran también una tendencia hacia una mayor inhibición a dosis mayores de rSIFN-co.

Todos los animales tratados con el artículo de prueba toleraron las dosis probadas bien sin signos de toxicidad o pérdida de peso. Los pesos corporales medios (en gramos) de los animales para el grupo de Vehículo, el grupo tratado con MMC, el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co fueron, respectivamente el día 0 (y el día 21): 22,7 (24,8); 23,9 (25,4); 23,7 (25,3); 24,3 (26,2); y 22,6 (24,4).

Ejemplo 2. Actividad del rSIFN-co sobre cáncer cervicouterino humano.

Este estudio demuestra la actividad y eficacia del rSIFN-co en el tratamiento del tumor cervicouterino humano, utilizando células Hela como modelo. Los resultados muestran que el rSIFN-co resultó activo y eficaz en la inhibición del crecimiento de células cancerosas cervicouterinas humanas. El estudio se realizó como en el Ejemplo 1, salvo que se indique específicamente otra cosa. Los xenoinjertos de cáncer cervicouterino humano primeramente se establecieron y prepararon de forma similar al Ejemplo 1, mediante inoculación de 5 x 10⁶ células Hela subcutáneamente en ratones desnudos y mediante dos pases de los xenoinjertos bien desarrollados dos veces en ratones desnudos. Después se prepararon fragmentos de 1.5 mm³ para la implantación s.c. en los animales. El peso corporal de los animales fue de media 19 ± 2 g al inicio de la dosis. En contraste con el Ejemplo 1, los animales empleados fueron todas hembras. Las dosis y pautas posológicas para cada grupo de tratamiento fueron similares a las del Ejemplo 1, a excepción de que la MMC se inyectó los días 1 y 13 después del inicio del tratamiento el día 0 y el estudio continuó durante un periodo de 28 días después del inicio del tratamiento.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la FIG. 2. La Tabla 3 muestra los VT medios calculados el día 0 y el día 28, así como el VTR medio calculado, T/C (%) y % de Inhibición. El VTR el día 28 (D28) fue 12,45 ± 4,46 para el grupo de Control de Vehículo, 4,97 ± 1,85 para el grupo tratado con MMC, 7,42 ± 1,91 para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, 6,64 ± 2,04 para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y 6,64 ± 1,60 para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co. El % de Inhibición el día 28 fue: 60,08 % para el grupo tratado con MMC, 40,40 % para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, 46,67 % para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y 46,67 % para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co. El T/C (%) correspondiente al grupo tratado con MMC, el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co y el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co fueron: 39,92 %, 59,60 %, 53,33 % y 53,33 %, respectivamente. Las diferencias en VTR entre cada grupo de tratamiento y el grupo de Control de Vehículo resultaron estadísticamente significativas. Los resultados mostraron que el rSIFN-co resultó eficaz en la inhibición del crecimiento del cáncer cervicouterino humano en los animales de prueba.

Tabla 3. Actividad del rSIFN-co sobre xenoinjertos de cáncer cervicouterino humano Hela

Tratamiento	VT(mm ³ , media±SD) (D0)	VT(mm ³ , media±SD) (D28)	VTR (media±SD)	T/C (%)	% Inhibición	Valor de p
suero salino normal (12 ratones)	138±25	1720± 756	12,45±4,46			
MMC	130± 28	676± 358	4,97± 1,85**	39,92	60,08	p<0,01
0,15 mg rSIFN -co	136 ± 25	1025± 400	7,42± 1,91*	59,60	40,40	p<0,05
0,10 mg rSIFN -co	135± 28	865± 186	6,64±2,04**	53,33	46,67	p<0,01
0,05 mg rSIFN -co	135± 26	886± 232	6,64±1,60**	53,33	46,67	p<0,01

La FIG. 2 muestra la progresión del VTR para cada grupo de tratamiento durante el periodo de estudio de 28 días, reflejando las mediciones del tumor hechas los días 4, 7, 11, 14, 18, 21,25 y 28 después del inicio del tratamiento. Los resultados mostraron retardo en el crecimiento del tumor cervicouterino en cada uno de los grupos tratados con MMC y con rSIFN-co el día 7, que se mantuvo hasta el día 28.

Todos los animales en el estudio toleraron los tratamientos de rSIFN-co sin síntomas de toxicidad. Se observó muy poco cambio en la media del peso corporal durante el periodo de tratamiento de 28 días.

Ejemplo 3. Actividad del rSIFN-co sobre cáncer de colon humano.

Este estudio se realizó para demostrar la actividad y la eficacia del rSIFN-co sobre el cáncer de colon humano, utilizando HT-29 como modelo. Los resultados mostraron que el rSIFN-co resultó activo y eficaz en la inhibición del crecimiento de células cancerosas de colon humanas. Este estudio se realizó como en el Ejemplo 1, salvo que se indique específicamente otra cosa. Los xenoinjertos de cáncer de colon humano primeramente se establecieron y prepararon de forma similar al Ejemplo 1, mediante inoculación de 5×10^6 células HT-29 subcutáneamente en ratones desnudos y mediante dos pases de los xenoinjertos bien desarrollados dos veces en ratones desnudos. Después, Después se prepararon fragmentos de 1.5 mm³ para la implantación s.c. en los animales de prueba. El peso corporal de los animales fue de media 20 ± 2 g al inicio de la dosis. En contraste con el Ejemplo 1, los animales empleados en este estudio fueron todas hembras. Las dosis y pautas posológicas para cada grupo de tratamiento son como se expone en el Ejemplo 1, excepto que la MMC se administró al Grupo 3 los días 1 y 10 y un grupo adicional, el Grupo 7, se añadió y en este grupo cada ratón se trató con IFN alfa-2b en un volumen de 0,15 ml y a una dosis de 0,15 mg/ratón, en días alternos como en los grupos tratados con rSIFN-co y ese tratamiento se llevó a cabo durante un total de 4 semanas. Este IFN-alfa-2b, a una concentración de 1,41 mg/ml, se consiguió a través de Huiyang Life Science and Technology Corp. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la FIG. 3.

Tabla 4. Actividad del rSIFN-co sobre xenoinjertos de cáncer de colon HT-29

Tratamiento	VT(mm ³ , media±SD) (D0)	VT(mm ³ , media±SD) (D28)	VTR (media±SD)	T/C (%)	% Inhibición	Valor de p
suero salino normal (12 ratones)	131 ±23	1107±424	8,41 ±2,82			
MMC (5 mg/kg)	132±22	395±95	3,12± 1,19***	37,10	62,9	p<0,001
rSIFN-co 0,15 mg	131 ±36	570±144	4,51 ± 1,25**	53,63	46,37	p<0,01
rSIFN-co 0,10 mg	128±39	541±196	4,22±0,87**	50,18	49,82	p<0,01
rSIFN-co 0,05 mg	130±26	416±166	3,28±1,25***	39	61	p<0,001
IFNalfa-2b 0,15 mg	128±44	831±420	6,26±1,43	74,44	25,56	p>0,05

La Tabla 4 muestra los VT medios iniciales calculados el día 0 y el los VT medios finales del día 28, así como el VTR medio calculado, T/C (%) y % de Inhibición. El VTR el día 28 (D28) fue $8,41 \pm 2,82$ para el grupo de Control de Vehículo, $3,12 \pm 1,19$ para el grupo tratado con MMC, $4,51 \pm 1,25$ para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, $4,22 \pm 0,87$ para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co, $3,28 \pm 1,25$ para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co y $6,26 \pm 1,43$ para el grupo tratado con IFN alfa-2b. El % de Inhibición el día 28 fue: 62,9 % para el grupo tratado con MMC, 46,37 % para el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, 49,82 % para el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co, 61 % para el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co y 25,56 % para el grupo tratado con IFN alfa-2b. El T/C (%) correspondiente al grupo tratado con MMC, el grupo tratado con 0,15 mg de rSIFN-co, el grupo tratado con 0,10 mg de rSIFN-co, el grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co y el grupo tratado con IFNalfa-2b fueron: 37,10 %, 53,63 %, 50,18 %, 39,00 % y 74,44 %, respectivamente. Los resultados mostraron que el rSIFN-co resultó más eficaz que el IFNalfa-2b en la inhibición del crecimiento de células cancerosas de colon humanas. Las diferencias en VTR entre cada grupo de tratamiento y el grupo de Control de Vehículo resultaron estadísticamente significativas.

La FIG. 3 muestra la inhibición del crecimiento de tumor de colon humano, representado por el VTR, para cada grupo de tratamiento durante el periodo de estudio de 28 días, reflejando las mediciones del tumor hechas los días 3, 7, 10,

14, 17, 21, 24 y 28, después del inicio del tratamiento. Los resultados mostraron retardo en el crecimiento del tumor de colon humano en cada uno de los grupos tratados con MMC y con rSIFN-co el día 7, que se mantuvo hasta el día 28. Cada una de las 3 dosis de rSIFN-co provocó mayor inhibición del crecimiento tumoral que el IFN alfa-2b.

Como en los Ejemplos 1 y 2, todos los animales tratados con rSIFN-co toleraron las dosis de prueba y no mostraron síntomas de toxicidad por fármacos y los cambios de peso fueron mínimos.

Ejemplo 4. Actividad del rSIFN-co sobre cáncer de pulmón humano.

Este estudio se realizó para demostrar la actividad y la eficacia del rSIFN-co sobre el cáncer de pulmón humano, utilizando SPC-A4 como modelo. Los resultados mostraron una inhibición significativa del crecimiento de tumor de pulmón humano por el rSIFN-co y que el rSIFN-co fue mucho más eficaz que el IFN alfa-2b. El estudio se realizó como en el Ejemplo 3, salvo que se indique específicamente otra cosa. Los xenoinjertos humanos para la inyección en los animales de prueba primeramente se establecieron y prepararon de forma similar al Ejemplo 1, mediante inoculación de $2,5 \times 10^6$ células SPC-A4 subcutáneamente (s.c.) en ratones desnudos y mediante dos pases de los xenoinjertos bien desarrollados dos veces en ratones desnudos. Después se usaron fragmentos de 1.5 mm^3 para la implantación s.c. en los animales de prueba. El peso corporal de los animales fue de media $22 \pm 2 \text{ g}$ al inicio de la dosis. En contraste con el Ejemplo 3, los animales utilizados en este estudio fueron todos machos y el estudio se realizó durante un periodo de tratamiento de 21 días. Las dosis y pautas posológicas para cada grupo de tratamiento son como se expone en el Ejemplo 3, excepto que la MMC se administró al Grupo 3 los días 1 y 6. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la FIG. 4.

Tabla 5

Efecto del rSIFN-co en el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de pulmón humano SPC-A4 en ratones desnudos.						
Tratamiento	VT(mm^3 , media $\pm$ SD) (D0)	VT(mm^3 , media $\pm$ SD) (D21)	VTR (media $\pm$ SD)	T/C (%)	% Inhibición	Valor de p
suero salino normal (12 ratones)	168 $\pm$ 42	7133 $\pm$ 2708	42,54 $\pm$ 2,82			
MMC (5 mg/kg)	166 $\pm$ 42	1831 $\pm$ 540	11,54 $\pm$ 4,37***	27,13	72,87	p<0,001
rSIFN-co 0,15 mg	169 $\pm$ 40	2284 $\pm$ 653	13,72 $\pm$ 3,96**	32,25	67,75	p<0,01
rSIFN-co 0,10 mg	168 $\pm$ 49	2388 $\pm$ 1544	14,91 $\pm$ 11,19**	35,05	64,95	p<0,01
rSIFN-co 0,05 mg	170 $\pm$ 41	2244 $\pm$ 1043	15,45 $\pm$ 9,07**	36,32	63,68	p<0,01
IFNalfa-2 b 0,15 mg	191 $\pm$ 44	4908 $\pm$ 2433	27,84 $\pm$ 15,51	65,47	34,53	p>0,05

La FIG. 4 muestra la inhibición del crecimiento de tumor de pulmón humano en ratones desnudos, representado por el VTR para cada grupo de tratamiento durante el periodo de estudio de 21 días, reflejando las mediciones del tumor hechas los días 4, 7, 11, 14, 18 y 21, después del inicio del tratamiento. Los resultados mostraron retardo en el crecimiento tumoral en cada uno de los grupos tratados con MMC y con rSIFN-co el día 7, que se mantuvo hasta el día 21, cuando finalizó el estudio. La inhibición de tumor no se observó con el grupo tratado con IFN alfa-2b hasta el día 11. La inhibición del crecimiento tumoral mediante el IFN alfa-2b fue menor que mediante cualquiera de los grupos tratados con el rSIFN-co y no fue estadísticamente significativa (p>0.05). Por lo tanto, el rSIFN-co fue más eficaz en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas pulmonares humanas que el IFN alfa-2b.

Como en los ejemplos 1 - 3, todos los animales toleraron las dosis probadas de los artículos de prueba y no se observaron síntomas de toxicidad o pérdida de peso, excepto el ratón del grupo tratado con 0,05 mg de rSIFN-co, que murió el día 17, por razones desconocidas.

Ejemplo 5. El r-SIFN-co redujo la viabilidad de diferentes células cancerosas sólidas humanas.

Los reactivos y el cultivo celular, las líneas celulares de cáncer de pulmón humano (A549, H1299, H460, Calu-1), las líneas celulares de cáncer de hígado humano (SMMC-7721, Huh-7, CL-1), la línea celular de carcinoma cervicouterino humano (Hela), la línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231), la línea celular de cáncer de páncreas (PANC-1) y las líneas celulares de cáncer de colon (SW620, HT29, SW480) se compraron a la Colección celular de Shanghai (Shanghai Cell Collection) (Shanghai, República Popular China). Las líneas celulares anteriores se cultivaron en CO₂ 5 % y a 37 °C en el medio de crecimiento completo correspondiente formulado por la Colección celular de Shanghai, con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Biochrom, Alemania), complementado con glutamina 4 mM, 50U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. Los medios de crecimiento completos fueron: F-12K (n.º de lote GNM21127; Hangzhou Gino Bio-Medical Technology Ltd.) para A549; L-15 (n.º de lote 41300-039, GIBCO) para SW620 y MDA-MB-231; DMEM (n.º de lote C11995, GIBCO) para SMMC-7721, Hela, Huh-7, CL-1 y PANC-1; RPMI-1640 (n.º de lote C11875, GIBCO) para H460, H1299 y SW480; Macro5a (n.º de lote M4892, Sigma) para HT-29; y DMEM+10 %FBS para Calu-1.

Se sembraron aproximadamente 5×10^3 células en 100 μl de medio completo por pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron durante la noche y después se trataron con IFN α -2b o rSIFN-co en concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$,

25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,13 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml y 0,20 µg/ml, respectivamente, durante aproximadamente 48 h, momento en el que se recolectaron las células para su análisis. La tasa de viabilidad celular se evaluó mediante el kit de ensayo Am-Azul de SunBio (N.º de catálogo: SBAB8025, Shanghai SBO Medical Biotechnology Co., Ltd, Shanghai, República Popular China). Según su protocolo, se añadieron 10 µl de Am-Azul a cada pocillo. Después las células se incubaron en CO₂ 5 % a 37 °C durante 4 horas. Después de agitar las placas durante 30 segundos, se leyó la absorbancia de cada pocillo tanto a 570 nm como a 595 nm mediante un lector de microplacas de Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Inc., Lowell, Massachusetts). La viabilidad celular relativa se calculó como sigue: Viabilidad celular = (grupo Tratado_(OD570 - OD595) menos Blanco_(OD570 - OD595))/(grupo de Control_(OD570 - OD595) menos Blanco_(OD570 - OD595)) x 100 %, en el que el grupo de Control fue el de células sin tratar correspondiente. Los resultados se muestran en la FIG. 5, en el que la viabilidad de las células tumorales se expresó como un porcentaje con respecto a las células de control que no se trataron. Cada dato (punto) representa la media de al menos dos experimentos independientes.

La FIG. 5 muestra la curva de respuesta a la dosis para cada línea celular, de (A) a (I), tratadas con rSIFN-co o IFNα-2b para reducir la viabilidad de las células cancerosas. (A) células A549; (B) células Hela; (C) células CL-1; (D) células Huh-7; (E) células SW480; (F) células MDA-MB-231; (G) células Calu-1; (H) células SMMC-7721; (I) células PANC-1.

Los resultados mostraron que el IFNα-2b incluso en su concentración mayor probada (100 µg/ml) no tuvo efecto o lo tuvo muy pequeño en la reducción de la viabilidad de las células A549, células Hela, células CL-1, células SW480 y células SMMC-7721. Se observó una reducción menor del 50 % en la viabilidad cuando se utilizó IFNα-2b a 100 mcg/ml (µg/ml) para tratar células Huh-7, células MDA-MB-231, células Calu-1 y células PANC-1. En contraste, el rSIFN-co consiguió reducir la viabilidad de las células tumorales de manera dependiente de la dosis a dosis mucho menores, con cerca del 50 % de reducción en la viabilidad celular a concentraciones entre 6,25 µg/ml y 12,5 µg/ml para células SW480, células MDA-MB-231 y células PANC-1 y entre 12,5 µg/ml y 25 µg/ml para células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células Calu-1 y células SMMC-7721. En general, el IC₅₀ para el rSIFN-co para reducir la viabilidad celular estuvo en un intervalo de aproximadamente 10 mcg/ml a 18 mcg/ml para diferentes células cancerosas. Con 100 mcg/ml de rSIFN-co, la viabilidad no se pudo detectar para ninguna de las líneas celulares de cáncer. Por tanto, el rSIFN-co resultó más eficaz en la reducción de la viabilidad de células tumorales que el IFN alfa-2b a cualquiera de las concentraciones probadas.

Ejemplo 6A. El rSIFN-co resultó más eficaz en la reducción de la viabilidad celular que el IFN alfa-2b.

Para demostrar la capacidad del rSIFN-co para reducir la viabilidad celular, las células tumorales A549 y SW620, se sembraron aproximadamente 2×10^3 células en 100 µl de medio completo por pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con 10 µg/ml de rSIFN-co o IFN alfa-2b, respectivamente, durante 1 - 6 días. La tasa de supervivencia celular se evaluó en un ensayo de MTT estándar (ensayo de bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma, San Luis, Misuri). Para el ensayo, se añadieron aproximadamente 20 µl de MTT (a 4 mg/ml) a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C durante 4 h. Después de eso, el sobrenadante de cada pocillo se extrajo cuidadosamente y después se añadió un volumen igual (150 microlitros) de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada pocillo y se mezcló completamente sobre un agitador durante 15 min. Se leyó la absorbancia de las placas a 595 nm en un lector de microplacas de Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., Lowell, Massachusetts). La viabilidad celular relativa se calculó como sigue: Viabilidad celular = (grupo Tratado_(OD595) menos Blanco_(OD595))/(grupo de Control_(OD595) menos Blanco_(OD595)) x 100 %.

Los resultados se expresan como un porcentaje con respecto a las células de control sin tratar. Cada dato (punto) representa la media de al menos dos (2) experimentos independientes. Como se muestra en la FIG. 6, el rSIFN-co disminuyó fuertemente la viabilidad celular de las células SW620 en una manera dependiente del tiempo, en contraste con el IFN alfa-2b, que tuvo poco efecto dependiente del tiempo, si lo tuvieron. El efecto dependiente del tiempo del rSIFN-co fue también aparente para las células A549 para solo aproximadamente los 3 primeros días de tratamiento. La diferencia en el efecto entre el rSIFN-co y el IFN alfa-2b en cada punto temporal para cada línea celular fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Estos datos mostraron un fuerte efecto antitumoral del rSIFN-co de una manera dependiente del tiempo.

Ejemplo 6B. El rSIFN-co inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*.

Este experimento se realizó de acuerdo con los Institutos Nacionales de guía de salud para el cuidado y utilización de animales de laboratorio (del inglés, National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Las hembras de ratones desnudos BALB/c, de 4 - 5 semanas de edad, se consiguieron del Shanghai Experimental Animal Center (Shanghai, República Popular China). Se inyectaron subcutáneamente aproximadamente 5×10^6 células A549 en cada ratón para establecer los tumores de xenoinjertos. Los animales se dividieron en (3) grupos aleatoriamente (8 ratones por grupo) y se trató a los animales con PBS (1 X PBS, pH 7.2-7.4), rSIFN-co a 100 µg/100 µl por ratón o con IFNα-2b, también a 100 µg/100 µl por ratón, intratumoralmente, en días alternos, 12 veces. Se midieron los tumores cada tres (3) días y se calcularon los volúmenes de los tumores como sigue: volumen del tumor (mm³) = (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la FIG. 16. Los datos se muestran como Media ± SD (n = 8). Los resultados demuestran que el rSIFN-co pudo inhibir casi completamente el crecimiento de tumores establecidos en comparación con el grupo tratado con PBS ($p < 0,0001$). Sin embargo, el IFNα-2b no exhibió una supresión destacable del crecimiento tumoral. Los resultados indicaron que el rSIFN-co fue más eficaz que el IFNα-2b en la

inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*.

Ejemplo 6C. El rSIFN-co inhibió la formación de colonias y la formación de pies invasivos (formación de pseudópodos) de células tumorales en sistemas de cultivo tridimensionales.

Se descongeló Matrigel (de BD Corporation, N.º de catálogo: 356234) en hielo a 4 °C en un refrigerador durante la noche y se congeló una placa de 24 pocillos a -20 °C durante la noche. Posteriormente, cada pocillo de la placa congelada de 24 pocillos se revistió con 150 µl del Matrigel a 1,0 mg/ml. La placa revestida de Matrigel se incubó después a 37 °C durante 20 - 30 min. Se tripsinizaron y contaron las células cancerosas pulmonares, A549. Se sembraron aproximadamente 5×10^3 células en medio condicionado que contenía Matrigel 2 % y 10 mcg/ml de IFN alfa-2b o rSIFN-co, o sin interferones como control sobre los pocillos revestidos con Matrigel. Las células se incubaron a 37 °C durante al menos aproximadamente 8 días. Se añadieron aproximadamente 200 µl del medio condicionado anterior cada 3 días para evitar que el medio se secase. En el 4º u 8º día, se tomaron fotos para observar el tamaño de las colonias y la formación de pies invasivos (pseudópodos). El experimento se realizó por triplicado.

Los resultados se muestran en la FIG. 7. Tras 4 días, se encontró que el grupo tratado con rSIFN-co (FIG. 7C) tuvo las colonias más pequeñas que el grupo sin tratamiento (FIG. 7A). Tras 8 días, el grupo tratado con rSIFN-co no solo tuvo las colonias más pequeñas de los 3 grupos, sino que se encontró que casi no hubo pseudópodos alrededor de las células (FIG. 7C, filas 2 y 3), mientras que la formación de pseudópodos fue obvia en las células del grupo sin tratamiento (FIG. 7A, filas 2 y 3) y del grupo tratado con el IFN alfa-2b (FIG. 7B, filas 2 y 3). Este experimento muestra que el rSIFN-co no solo pudo suprimir el crecimiento de la colonia de células cancerosas, sino que también pudo inhibir la formación de pies invasivos en las células cancerosas, una característica que es necesaria para la metástasis.

Ejemplo 7. Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF mediante rSIFN-co.

Ensayo de reportero de transcripción de beta-catenina/TCF. Se determina el efecto del rSIFN-co sobre la señalización Wnt/Beta-catenina *in vitro*. Las células cancerosas se sembraron en placas de 96 pocillos (1 x 10⁴ células por pocillo) y se incubaron durante 12 horas, después de lo que se transfectaron transitoriamente con aproximadamente 100 ng de TOPFlash (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América). Para normalizar la eficacia de transfección, las células se cotransfectaron con 1 ng de reportero de control interno luciferasa de Renilla reniformis dirigido con el promotor de SV40, pRL-SV40 (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América) y después se trataron con 10 mcg/ml de interferones, rSIFN-co o IFN alfa-2b, o permanecieron sin tratar como Control (Señuelo) después de la transfección durante 6 horas. Después del tratamiento con interferón durante 24 horas, el ensayo de luciferasa se realizó utilizando el kit de ensayo de sistema de luciferasa dual (Dual Luciferase Assay System) de acuerdo con los protocolos del fabricante (N.º de catálogo: E1960, Promega). Se determinó la actividad de luciferasa relativa como una proporción de la actividad de luciferasa luciérnaga/renilla. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados, mostrados en la FIG. 8, indicaron que el rSIFN-co disminuyó la actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF en células cancerosas sólidas humanas. Después del tratamiento durante 24 horas, la actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF se suprimió significativamente mediante el rSIFN-co en tres células cancerosas pulmonares (A549, H1299, H460) y dos células cancerosas de colon (HT-29, SW620) (*, p<0,05, **, p<0,01). Sin embargo, el efecto inhibitorio de IFN alfa-2b no existió para las células A549, células H1299, las células H460 y las células HT-29 y resultó en mejora, en lugar de inhibición.

En resumen, las proporciones de Luciérnaga/Renilla para el grupo de Control, el grupo tratado con IFN alfa-2b y el grupo tratado con rSIFN-co fueron, respectivamente: (A) para las células A549: aproximadamente 310, aproximadamente 350 y aproximadamente 100; (B) para las células H1299: aproximadamente 800, aproximadamente 1000 y aproximadamente 500; (C) para las células H460: aproximadamente 450, aproximadamente 500 y aproximadamente 280; (D) para las células HT-29: aproximadamente 300, aproximadamente 600 y aproximadamente 200; (E) para las células SW620: aproximadamente 1500, aproximadamente 1200 y aproximadamente menos de 100. Este estudio muestra que el rSIFN-co fue superior al IFNα-2b en la supresión de la señalización Wnt/TCF y por lo tanto, en su efecto antitumoral.

Ejemplo 8. El rSIFN-co disminuyó el nivel de la proteína beta-catenina en células cancerosas.

Las células cancerosas, A549 y Sw480, se cultivaron hasta aproximadamente el 85 % de confluencia y se pusieron en 6 placas de pocillos. Las células se trataron con 10 mcg/ml de IFNα-2b o rSIFN-co o se dejaron sin tratar como control (Señuelo) durante 24 h, 48 h o 72 h, respectivamente. Después del tratamiento, las células se recolectaron para transferencia Western para detectar el nivel de proteína de beta-catenina, utilizando su anticuerpo específico, con GAPDH como control de carga endógeno. El experimento se realizó por triplicado.

Análisis de transferencia Western. Para determinar la expresión de varias proteínas, se recolectaron las células de las placas y la proteína celular total se extrajo utilizando reactivos de extracción (N.º de catálogo: P0013) siguiendo el protocolo del fabricante (Beyotime, República Popular China). La concentración de proteína total se determinó mediante el kit de ensayo de proteína de Lowry (Bio-Rad, Estados Unidos de América). Las proteínas totales se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) en gel al 10 % - 12 % y después se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,22 o 0,45 µm (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts,

Estados Unidos de América). Se bloquearon las membranas con leche desnatada 5%, albúmina de suero bovino, Tris-HCl 10 mmol/l a pH 8,0, NaCl 150 mol/l y Tween 20 0,05 % durante la noche a 4 °C. Las membranas bloqueadas se incubaron con anticuerpos primarios (diluciones 1:1000), seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las manchas se visualizaron utilizando el sistema Luminescence/Fluorescence Imaging LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos de América) con el kit de sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Estados Unidos de América).

Para esta determinación, los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpos anti-beta-catenina monoclonales de ratón (1:1000; Santa Cruz Technology, Santa Cruz, California) y anticuerpos anti-GAPDH monoclonales de ratón (1:2000) (Kangwei Biotechnology, República Popular China). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP de antirratón (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, California) se utilizaron a concentraciones de 1:2000. Los resultados, mostrados en la FIG. 10, demuestran que en cuanto a las células A549, el rSIFN-co disminuyó drásticamente el nivel de proteína beta-catenina después del tratamiento durante 2 días (48h). Se observó una disminución adicional, para estas células, después del tratamiento durante 3 días (72 h). El descenso en el nivel de proteína beta-catenina en las células SW480 fue obvio después de 72 h de tratamiento con rSIFN-co. La regulación a la baja de la beta-catenina fue aparentemente dependiente del tiempo tanto en las células de cáncer A549 como en las células de cáncer de colon SW480. En contraste, el IFN alfa-2b no provocó ninguna disminución aparente en el nivel de beta-catenina, lo que sugiere que no tuvo efecto en la regulación a la baja de beta-catenina.

Ejemplo 9. El rSIFN-co indujo la regulación a la baja transcripcional de genes diana mediados por la ruta Wnt.

Las células A549 de cáncer de pulmón se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con 10 µg/ml de IFN alfa-2b o rSIFN-co, respectivamente o se dejaron sin tratar como control (señuelo). Después de 24 h de tratamiento, el ARNm celular total se aisló utilizando el reactivo TRIZOL y se sintetizó ADNc y adicionalmente se sometió a qPCR, utilizando cebadores específicos de cuatro (4) genes corriente abajo de señalización Wnt, Axin2, CD24, Survivina e ID2. El experimento se realizó por triplicado y se normalizó con el grupo Señuelo.

Análisis cuantitativo de PCR (qPCR). El ARNm se aisló utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, California) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) utilizando el kit de RT-PCR (N.º de catálogo: FSQ-101, TOYOBO, Japón) según las instrucciones del fabricante y después se sometió a PCR cuantitativa (qPCR) con un kit de PCR SYBR Green (N.º de catálogo: QPK-201, TOYOBO, Japón). Los cebadores los cuatro genes diana de la ruta Wnt fueron como sigue: cebadores sentido de Axin2: 5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3' (SEQ ID NO:8) y cebador antisentido: 5'-GCTGTTGTTCTCAATGTA-3' (SEQ ID NO: 9); cebador sentido de CD24: 5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3' (SEQ ID NO:10) y cebador antisentido: 5'-GAAAGTGAATCTCCATTCCACAA-3' (SEQ ID NO: 11); Cebadores sentido de Survivina: 5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3' (SEQ ID NO:12) y cebador antisentido: 5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTC-3' (SEQ ID NO: 13) y cebador sentido de ID2: 5'-CACAACAACAACAACAAC-3' (SEQ ID NO:14) y cebador antisentido: 5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3' (SEQ ID NO: 15).

El protocolo de amplificación consistió en incubaciones a 95 °C durante 1 minuto, 40 ciclos (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 30 segundos). La incorporación del colorante SYBR Green en los productos de PCR se monitorizó en tiempo real con un sistema de detección Bio-Rad y después se analizaron utilizando el software Bio-Rad CFX manager 2.1. Las muestras se agruparon para cada proceso y se ejecutaron por duplicado. Las muestras tratadas con interferón se compararon con las del Señuelo utilizando el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se representaron gráficamente como factor de cambio. Se utilizó GAPDH como el control de normalización.

Los resultados, mostrados en la FIG. 11, demuestran que el rSIFN-co indujo la regulación a la baja transcripcional de genes diana mediados por la ruta Wnt, Axin2, CD24, Survivina e ID2. El nivel de ARNm de estos genes se redujo significativamente después del tratamiento con rSIFN-co pero no después del tratamiento con interferón IFN alfa-2b.

En resumen, cuando el nivel de expresión relativo para el control Señuelo se fijó en 1, para el gen Axin2 (FIG. 11A), el tratamiento de IFN alfa-2b resultó en un nivel ligeramente por encima de 1, mientras que el tratamiento de rSIFN-co resultó en un nivel de aproximadamente 0,4 ($p < 0,0001$, comparando el tratamiento de rSIFN-co con la ausencia de tratamiento). Los niveles correspondientes para el gen CD24 (FIG. 11B) fueron 1, aproximadamente 0,9 y aproximadamente 0,4 ($p < 0,0001$), respectivamente; para el gen Survivina (FIG. 11C) fueron 1, aproximadamente 0,9 y aproximadamente 0,4 ($p < 0,0005$), respectivamente; para el gen ID2 (FIG. 11D) fueron 1, aproximadamente 1 y aproximadamente 0,4 ($p < 0,0001$), respectivamente, para las células sin tratar Señuelo, las células tratadas con IFN alfa-2b y las células tratadas con rSIFN-co, respectivamente.

Ejemplo 10. El rSIFN-co pudo regular a la baja el nivel de ARNm de los receptores relacionados con Wnt o correceptores LRP6/FZD6 en diferentes células.

Se investigó la regulación de LRP6/FZD6 mediante el rSIFN-co. Se realizó mediante qPCR tal como se llevó a cabo en el Ejemplo 9. Las células cancerosas, A549, H460, SW620 y HT-29, se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con 10 µg/ml de IFN alfa-2b o rSIFN-co o se dejaron sin tratar como control (Señuelo). Después de 24 h de tratamiento, el ARNm celular total se aisló utilizando el reactivo TRIZOL y el ADNc se sometió a qPCR utilizando los cebadores específicos de LRP6 y FZD6. Los cebadores utilizados fueron: cebador sentido de LRP6: 5'-

TGAAGAACCAGCACCACAGG-3' (SEQ ID NO: 4) y cebador antisentido: 5'-CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3' (SEQ ID NO: 5) y cebador sentido de FZD6: 5'-GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3' (SEQ ID NO: 6) y cebador antisentido: 5'-TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC-3' (SEQ ID NO: 7). Los experimentos se realizaron por triplicado y se normalizaron con el grupo de control Señuelo. Los resultados se registraron como el nivel de ARNm relativo de LRP6 o FZD6 con respecto a GAPDH.

Los resultados, mostrados en la FIG. 9, indicaron que tanto LRP6 como FZD6 resultaron regulados a la baja en diferentes magnitudes mediante el rSIFN-co en las cuatro líneas celulares de cáncer. La FIG. 9A muestra la reducción significativa en la expresión relativa del ARNm de LRP6 en células A549 ($p < 0,005$), células SW620 ($p < 0,005$) y células HT-29 ($p < 0,005$) después del tratamiento con rSIFN-co, pero no se observó reducción significativa con el tratamiento con IFN alfa-2b. La FIG. 9B muestra la reducción significativa de la expresión relativa de ARNm de FZD6 en las 4 líneas celulares, A549 ($p < 0,001$), H460 ($p < 0,0005$), SW620 ($p < 0,001$) y HT-29 ($p < 0,0005$) después del tratamiento con rSIFN-co. El otro interferón, el IFN alfa-2b provocó la mejora de la expresión de ARNm de FZD6 en células HT-29, pero indujo cierta reducción en la expresión de ARNm de FZD6, aunque no con el mismo alcance que el rSIFN-co, en células A549, células H460 y células SW620. Los resultados indican que la supresión de la ruta de señalización Wnt mediante el rSIFN-co puede haber resultado de la inhibición de la expresión de los receptores de superficie celular LRP6 y FZD6 relacionados con Wnt. Se encontró al rSIFN-co superior al interferón IFN-2b en la supresión de la ruta Wnt, en las células cancerosas humanas probadas, tales como las células cancerosas pulmonares humanas y las células cancerosas de colon humanas, incluyendo la regulación a la baja de la actividad transcripcional mediada por beta-catenina/TCF y del nivel de proteína beta-catenina, así como los receptores relacionados con la ruta de señalización Wnt, correceptores y genes diana.

Ejemplo 11. El rSIFN-co reguló al alza la expresión de genes supresores de tumores.

El efecto del rSIFN-co sobre la regulación al alza de genes supresores de tumores se demostró en este estudio. Las células cancerosas, A549, H460, SW620 y HT-29, se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con 10 mcg/ml de IFN alfa-2b o rSIFN-co o se dejaron sin tratar como control Señuelo. Después de 24 h de tratamiento, el ARNm celular se aisló utilizando el reactivo TRIZOL y se sintetizó ADNc y adicionalmente se sometió a qPCR utilizando cebadores específicos para DKK3, KLF4 y BATF2. Se utilizaron los siguientes cebadores: para BATF2, los cebadores sentido: 5'-CAGAGCAGGGAGCACAAACC-3' (SEQ ID NO:16) y los cebadores antisentido: 5'-TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG-3' (SEQ ID NO:17); para DKK3, los cebadores sentido: 5'-GGAGCCTGACTGAAGAGATGG-3' (SEQ ID NO:18) y los cebadores antisentido: 5'-ACGCCTAAAGCACACACCTG-3' (SEQ ID NO:19); para KLF4, los cebadores sentido: 5'-CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO:20) y los cebadores antisentido: 5'-GGCTGCTGCGGCGGAATG-3' (SEQ ID NO:21).

El experimento se realizó por triplicado y se normalizó con el grupo de control señuelo. Los resultados, mostrados en la FIG. 12, se expresaron como el nivel de expresión de ARNm relativo con respecto a GAPDH. Para las células A549, el tratamiento con rSIFN-co aumentó drásticamente la expresión de los 3 genes supresores de tumores, DKK-3 (FIG. 12A), BATF2 (FIG. 12B) y KLF4 (FIG. 12C) y fue mucho más eficaz que el IFN alfa-2b. En células SW620, la regulación al alza de la expresión de KLF4 después del tratamiento con rSIFN-co se incrementó también drásticamente en comparación con el control y el tratamiento de IFN alfa-2b. El tratamiento con IFN alfa-2b aumentó drásticamente la expresión de DKK-3 en células H460.

Ejemplo 12. El rSIFN-co inhibió la migración de células cancerosas.

La capacidad del rSIFN-co para suprimir la migración de células tumorales se demostró mediante la determinación de la capacidad de las células A549 de cáncer de pulmón y de las células SW620 de cáncer de colon para migrar a través de membranas de microporos después del tratamiento con IFN alfa-2b o rSIFN-co durante 24 h, en comparación con los controles sin tratamiento (Señuelo). El ensayo de migración celular se realizó utilizando insertos de cultivos celulares de 8 µm en placas de 24 pocillos (Becton-Dickinson Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos de América). Se añadió medio de cultivo basado en bicarbonato tibio a 37 °C sin añadir SBF al interior de los insertos y al fondo de los pocillos y se permitió la rehidratación durante aproximadamente 2 h en un incubador de cultivo tisular humidificado a 37 °C en CO₂ 5 %. Después de la rehidratación, el medio de cultivo se eliminó cuidadosamente. Posteriormente, y los 500 µl de las células preparadas (después del tratamiento con 10 µg/ml de IFN alfa-2b o 10 µg/ml rSIFN-co o sin haberse tratado en absoluto) suspendidas en medio libre de SBF, se sembraron sobre las caras superiores de los filtros de los insertos a una densidad de aproximadamente 0,5 x 10⁴ células/inserto. Se añadieron 500 µl de medio completo con SBF 10 % al compartimento más bajo de las placas de 24 pocillos. Después de 24 h a 37 °C en condiciones de cultivo normales, las células no migradas a la cara superior de las membranas de las cámaras se eliminaron con un hisopo de algodón. Las superficies inferiores de los insertos de cultivo que contienen las células migradas se fijaron con paraformaldehído 4 % y se tiñeron con cloruro de metilrosanilina 2 %. Se contó el número de células migradas sobre la cara opuesta de las membranas de las cámaras desde las que se colocaron las células en cada uno de los pocillos triplicados. Cada experimento se repitió al menos dos veces, cada vez con pocillos triplicados.

Los resultados, mostrados en la FIG. 13, indicaron el número medio de células migradas por campo para los Señuelos, las células tratadas con IFN alfa-2b y las células tratadas con rSIFN-co. Para las células A549 que habían migrado a través de la membrana, se observaron aproximadamente 30 células por campo en el grupo Señuelo sin tratamiento, aproximadamente 110 células en el grupo IFN alfa-2b y aproximadamente 10 células en el grupo tratado con rSIFN-

co. La mejora de la migración provocada por el tratamiento de IFN alfa-2b y la inhibición de la migración provocada por el tratamiento con rSIFN-co fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se observó también una inhibición significativa mediante el rSIFN-co con células SW620. En contraste, el tratamiento con IFN alfa-2b tuvo como resultado la mejora en la migración de células tumorales SW620. Por lo tanto, el rSIFN-co resultó eficaz en la inhibición de la migración de células tumorales y fue mucho más eficaz que el IFN alfa-2b.

Ejemplo 13. El rSIFN-co no ejerció su efecto a través de la ruta de apoptosis.

Este estudio se realizó para mostrar que el rSIFN-co ejerció su efecto sobre la reducción de la viabilidad de células tumorales de otro modo que no fue la ruta apoptótica. Las células tumorales A549 y SW620, se sembraron en placas de 6 pocillos, y se incubaron durante la noche y después se trataron con 10 mcg/ml de IFN alfa-2b o 10 mcg/ml de rSIFN-co o con 5FU o se dejaron sin tratar (como control Señuelo) durante 24 h o 48 h. Posteriormente, los marcadores moleculares relacionados con apoptosis se monitorizaron mediante transferencia Western. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpos anti-beta-tubulina monoclonales de ratón (1:2000, N.º de catálogo: CW0098A) y anti-GAPDH monoclonal de ratón (1:2000, N.º de catálogo: CW0100A) (Kangwei Biotechnology, República Popular China); anti-PARP monoclonal de ratón (1:1000, N.º de catálogo: sc-2007, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-procaspasa 3 monoclonal de conejo (1:1000, N.º de catálogo: 9665) y anti-caspasa escindida 3 policlonal de conejo (1:1000, N.º de catálogo: 9661) (Cell Signaling Technology, Estados Unidos de América); anti-procaspasa 8 policlonal de cabra (1:1000, N.º de catálogo: sc-6136, Santa Cruz Biotechnology, Inc); anti-caspasa escindida 8 monoclonales de conejo (1:1000, N.º de catálogo: 9496) (Cell Signaling Technology, Estados Unidos de América).

Los resultados se muestran en la FIG. 14A, para las células A549 y en la FIG 14B para las células SW620. Las transferencias Western mostraron que después del tratamiento con 5FU, un fármaco conocido por provocar apoptosis, las células exhibieron una reducción significativa en el nivel de procaspasa-3, procaspasa-8 y PARP, pero mostraron un nivel mejorado de la caspasa-3 escindida y de la caspasa-8 escindida. En contraste, ninguno de los interferones, IFN alfa-2b o rSIFN-co, provocaron reducción alguna en el nivel de procaspasa-3 o procaspasa-8 o PARP o indujeron ninguna mejora en el nivel de la caspasa-3 escindida o caspasa-8 escindida. Por tanto, los resultados indicaron que los dos interferones, especialmente el rSIFN-co, probablemente provocaron reducción en la viabilidad de las células tumorales mediante un mecanismo diferente al de la apoptosis.

Ejemplo 14. El rSIFN-co indujo fosforilación STAT.

Este experimento se realizó para mostrar que el rSIFN-co utilizó la ruta de señalización JAK/STAT igual que el IFN alfa-2b. En este estudio, las células A549 y las células Hela se sembraron en placas de 3,3 cm, se incubaron durante la noche a 37 °C y después se trataron con 10 µg/ml de IFN alfa-2b o rSIFN-co durante 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos, respectivamente. Después del tratamiento, se recolectaron las células, las proteínas celulares se extrajeron y se cargaron en agarosa SDS-PAGE para análisis de transferencia Western para observar la fosforilación de STAT1 (Tyr701), STAT2 (Tyr690) y STAT3 (Tyr705). Se utilizó GAPDH como un control de carga.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: STAT1 (1:1000, N.º de catálogo: 9175S), STAT1 fosforilada Tyr701 (1:1000, N.º de catálogo: 9167S), STAT2 (1:500, N.º de catálogo: 4594), STAT2 fosforilada Tyr690 (1:1000, N.º de catálogo: 441S), STAT3 (1:1000, N.º de catálogo: 9132), STAT3 fosforilada Tyr705 (1:1000, N.º de catálogo: 9145S). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP de antirratón (N.º de catálogo: sc-2005) o conejo (N.º de catálogo: sc-2004) o cabra (N.º de catálogo: sc-2020) (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, California) se utilizaron a concentraciones de 1:2000. Las manchas se visualizaron utilizando el sistema Luminescence/Fluorescence Imaging LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos de América) con el kit de sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Estados Unidos de América).

Los resultados, mostrados en la FIG. 15, demostraron que los 2 interferones, IFN alfa-2b y rSIFN-co, se comportaron análogamente en cuanto a sus patrones de fosforilación para STAT1, STAT2 y STAT3 tanto en células A549 como en células Hela. Por lo tanto, el nivel de señalización JAK/STAT mediado por el rSIFN-co no fue distinto del mediado por el IFN alfa-2b, lo que sugiere que rSIFN-co y IFN alfa-2b pueden compartir los receptores comunes IFNAR1/2.

Aplicabilidad industrial

Los procedimientos y kits de ensayo descritos en el presente documento son útiles para determinar la potencia de un compuesto de prueba, tal como un interferón y para el tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones que están negativamente afectadas por la sobreactivación o sobreexpresión de beta-catenina o de uno o más de LRP6, FZD6, Axin2, CD24, Survivina e ID2 o mediante regulación a la baja de DKK3, BATF2 o KLF4.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Superlab Far East Limited

<120> PROCEDIMIENTOS PARA DETERMINAR INTERFERÓN QUE TIENE EFECTOS INHIBIDORES DIRECTOS SOBRE TUMORES Y USOS DEL MISMO

<130> 1749-PCT

<140>

<141>

<150> US 61/903.937

<151> 13/11/2013

5 <160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 167

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de interferón recombinante

<400> 1

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu
100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

15 <210> 2

<211> 504

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de nucleótidos que codifica interferón recombinante	
5	<400> 2	
	atgtgcgacc tgccgcagac ccaactccctg ggtaaccgtc gtgctctgat cctgctggct	60
	cagatgcgtc gtatctcccc gttctcctgc ctgaaagacc gtcacgactt cggtttcccg	120
	caggaagaat tgcacggtaa ccagttccag aaagctcagg ctatctccgt tctgcacgaa	180
	atgatccagc agaccttcaa cctgtttctc accaaagact cctccgctgc ttgggacgaa	240
	tccctgctgg aaaaattcta caccgaactg taccagcagc tgaacgacct ggaagcttgc	300
	gttatccagg aagttggtgt tgaagaaacc ccgctgatga acgttgactc catcctggct	360
	gttaaaaaat acttccagcg tatcacctg tacctgaccg aaaaaaata ctccccgtgc	420
	gcttgggaag ttgttcgtgc tgaaatcatg cgttccttct ccctgtccac caacctgcag	480
	gaacgtctgc gtcgtaaaga ataa	504
	<210> 3	
	<211> 504	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de nucleótidos que codifica interferón recombinante	
	<400> 3	
	tacacgctgg acggcgtctg ggtgaggagc ccattggcag cacgagacta ggacgaccga	60
	gtctacgcag catagagggg caagaggacg gactttcttg cagtgctgaa gccaaagggc	120
	gtccttctta agctgccatt ggtcaaggtc tttcgagtcc gatagaggca agacgtgctt	180
	tactaggtcg tctggaagtt ggacaagagg tggtttctga ggaggcgacg aaccctgctt	240
	agggacgacc tttttaagat gtggcttgac atggctcgtcg acttgctgga ccttcgaacg	300
	caataggtcc ttcaaccaca acttcttttg ggcgactact tgcaactgag gtaggaccga	360
	caatttttta tgaaggctcg atagtgggac atggactggc ttttttttat gaggggcacg	420
	cgaacccttc aacaagcacg acttttagtac gcaaggaaga gggacaggtg gttggacgtc	480
	cttgacagcg cagcatttct tatt	504
15	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador sentido	
	<400> 4	
	tgaagaacca gcaccacagg	20
	<210> 5	

	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 5	
	cataaccaag aggcacagaa gc	22
10	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido	
15	<400> 6	
	gcggagtga ggaaggatta gtc	23
20	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 7	
	tgaacaagca gagatgtgga acc	23
25	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido	
30	<400> 8	
	cgtggatacc ttagactt	18
35	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 9	
	gctgtgtgtc tcaatgta	18
40	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador sentido	
	<400> 10	
	tgaagaacat gtgagagggt tgac	24
50	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Cebador antisentido	
	<400> 11 gaaaactgaa tctccattcc acaa	24
5	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sentido	
	<400> 12 accgcatctc tacattcaag	20
15	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador antisentido	
20	<400> 13 caagtctggc tcgttctc	18
	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sentido	
	<400> 14 cacaacaaca acaacaac	18
30	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador antisentido	
35	<400> 15 cacagtccaa gtaagaga	18
	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador sentido	
	<400> 16 cagagcaggg agcacaacc	20
45	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador antisentido	

	<400> 17 tgagcagagg agagcagagg	20
5	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sentido	
10	<400> 18 ggagcctgac tgaagagatg g	21
	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador antisentido	
	<400> 19 acgcctaaag cacacacctg	20
20	<210> 20 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sentido	
25	<400> 20 ccttcaacct ggcggacatc aac	23
	<210> 21 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador antisentido	
	<400> 21 ggctgctgcg gcggaatg	18

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación o comparación de la potencia de un interferón de prueba con respecto al supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co) o establecer equivalencia entre un interferón de prueba y el rSIFN-co, que comprende:

- 5 (1) proporcionar el interferón de prueba y el rSIFN-co; y
 (2) determinar la regulación a la baja de la expresión de LRP6 y FZD6 en células HT-29 mediante el interferón de prueba y el rSIFN-co, *in vitro*, en las mismas condiciones especificadas, respectivamente;

10 por lo cual la presencia de regulación a la baja de la expresión de LRP6 y FZD6 en células HT-29 de forma estadísticamente significativa mediante el interferón de prueba, significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma potencia o que el interferón de prueba y el rSIFN-co son equivalentes.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en que según la etapa (2) una o más de las siguientes actividades puede determinarse adicionalmente:

- 15 (a) Inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vivo* en uno o más modelos de ratones portadores de tumores;
 (b) Reducción de la viabilidad de células cancerosas;
 (c) Inhibición de la migración de células cancerosas;
 (d) Inhibición de la actividad transcripcional de beta-catenina/TCF en células cancerosas;
 (f) Inhibición de la expresión de uno o más de: Axin2, CD24, Survivina e ID2 en células cancerosas;
 (g) Inhibición de la formación de pseudópodos en células cancerosas;
 (h) Inhibición de la expresión de beta-catenina en células cancerosas; y
 (i) Regulación al alza de la expresión de uno o más de: DKK-3, KLF-4 y BATF2 en células cancerosas;

25 por lo cual las actividades (b) a (i) se determinan en condiciones *in vitro* y la presencia de regulación a la baja de la expresión de LRP6 y FZD6 en células HT-29 mediante el interferón de prueba, en combinación con la actividad especificada en (f) de forma estadísticamente significativa y/o 1, o 2, o 3, o 4 de las actividades especificadas en (a), (b), (c) y (d) de forma estadísticamente significativa y/o la presencia en el interferón de prueba de una o más de las actividades especificadas en (g), (h) e (i), adicionalmente significa que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma potencia o que el interferón de prueba y el rSIFN-co son equivalentes.

30 3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células cancerosas empleadas para determinar una o más actividades comprenden una o más de: células cancerosas pulmonares, células cancerosas de colon, células cancerosas cervicouterinas, células cancerosas hepáticas, células cancerosas mamarias y células cancerosas pancreáticas.

35 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células cancerosas empleadas para determinar una o más actividades comprenden una o más de: células A549, células Hela, células CL-1, células Huh-7, células SW480, células MDA-MB-231, células Calu-1, células SMMC-7721, células PANC-1, células SW620, células SPC-A4, células H1299, células H460 y células HT-29.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que la significación estadística quiere decir un valor de p menor que o igual a 0,05, o menor que o igual a 0,01, o menor que o igual a 0,005, o menor que o igual a 0,001, o menor que o igual a 0,0005, o menor que o igual a 0,0001, en comparación con un control.

40 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el control no se trata con el interferón de prueba o el rSIFN-co, o se trata con suero salino normal o PBS, o se trata con IFN α -2b, o el control es un control sin tratamiento (Señuelo).

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de aminoácidos del interferón de prueba es al menos un 90 %, opcionalmente, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % idéntica a la del rSIFN-co (SEQ ID NO: 1).

45 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y están codificados por la misma secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2).

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el interferón de prueba y el rSIFN-co tienen la misma actividad específica.

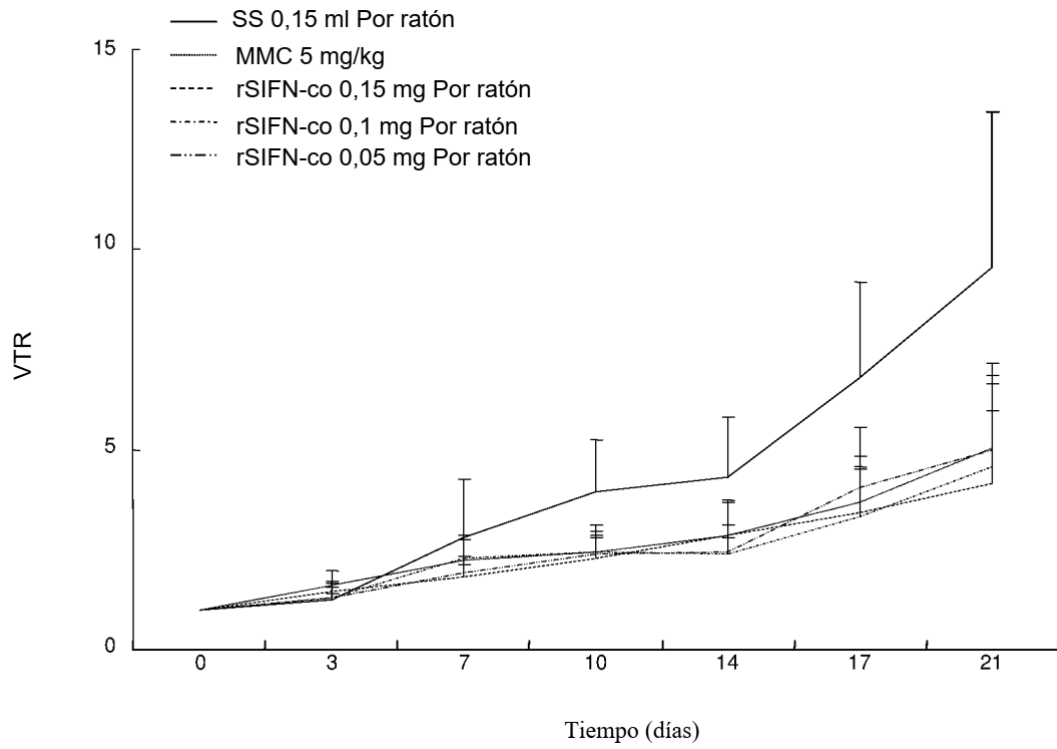


FIG. 1

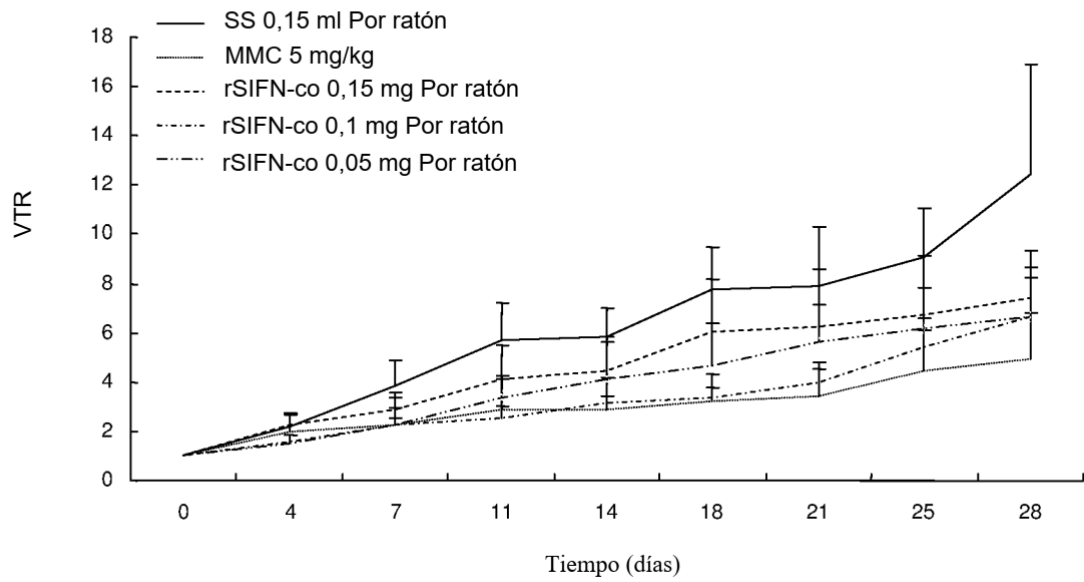


FIG. 2

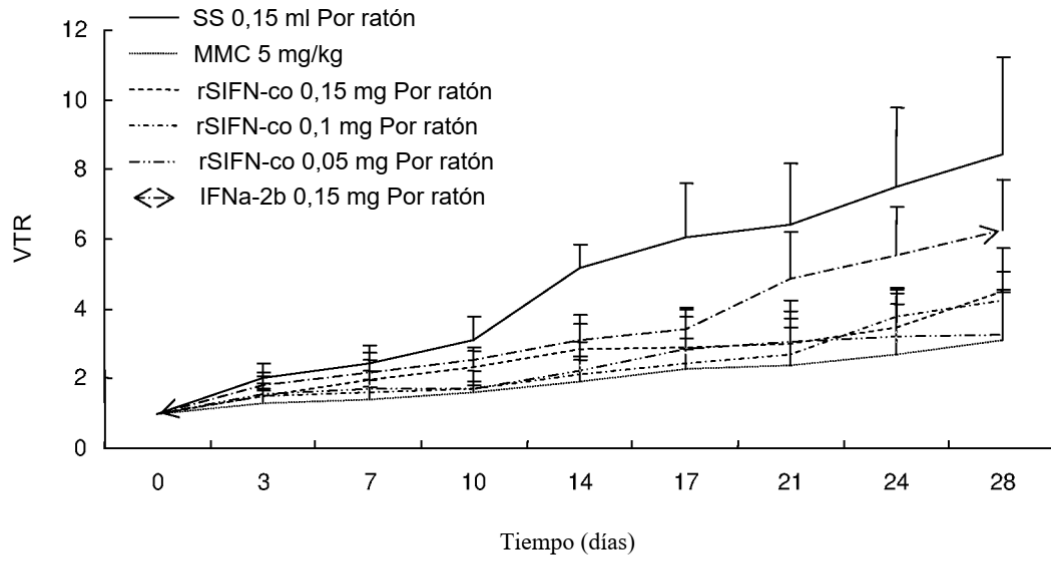


FIG. 3

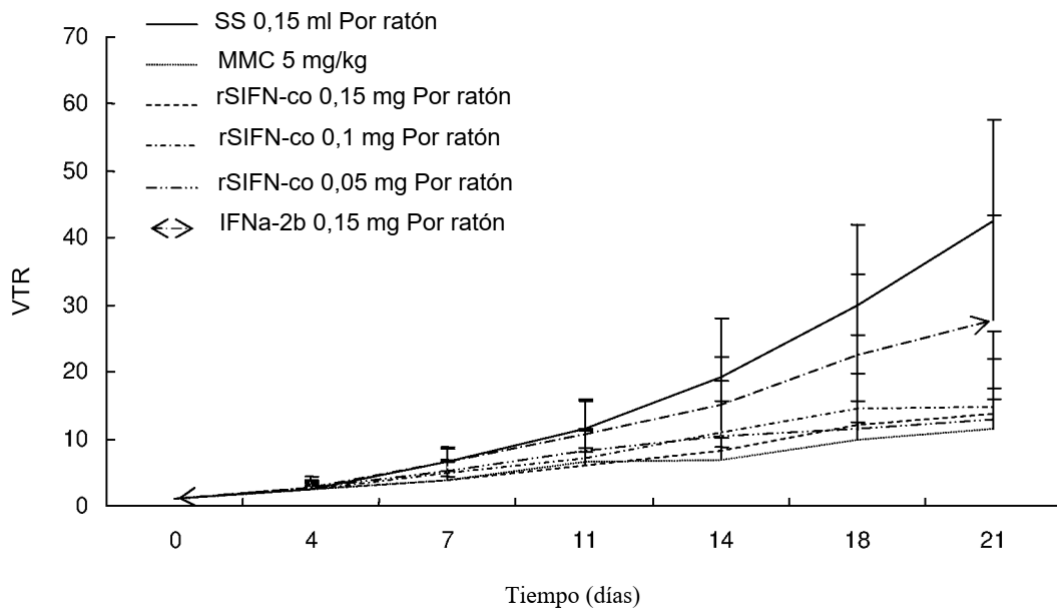


FIG. 4

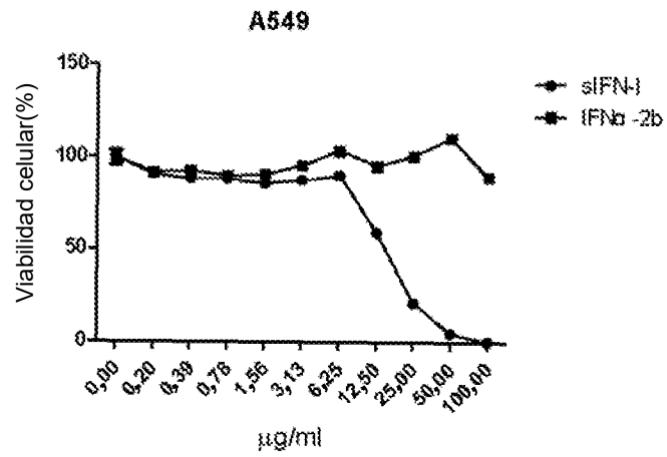


FIG. 5A

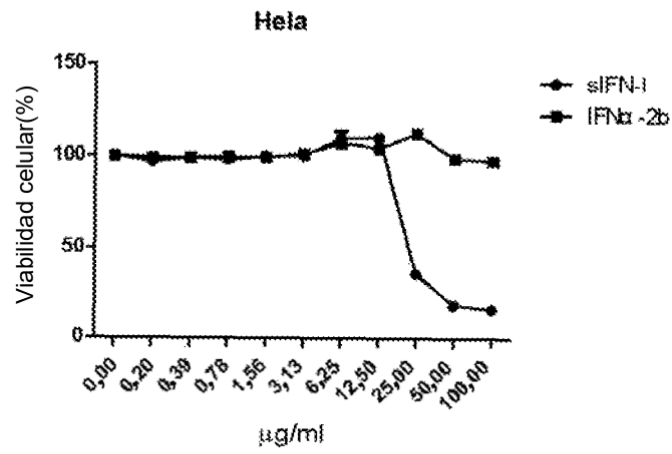


FIG. 5B

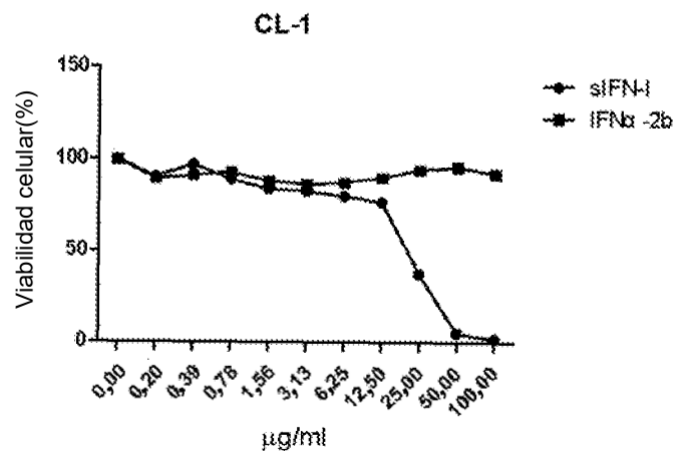


FIG. 5C

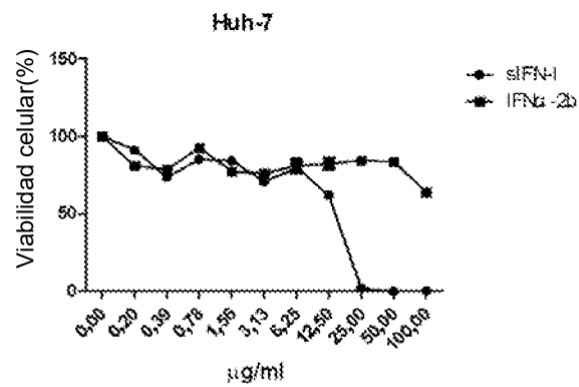


FIG. 5D

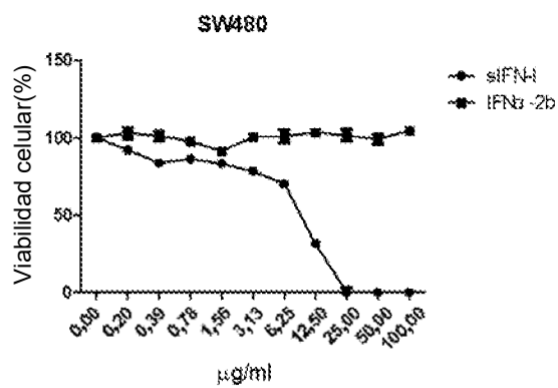


FIG. 5E

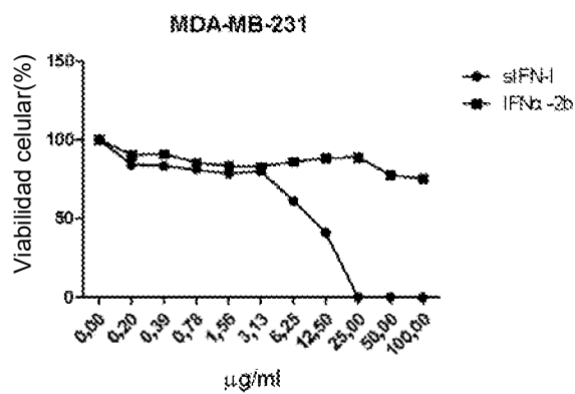


FIG. 5F

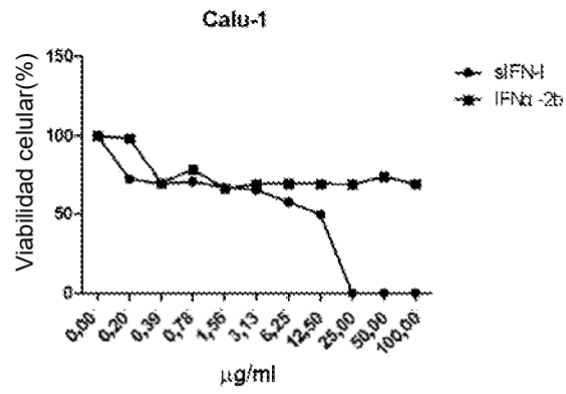


FIG. 5G

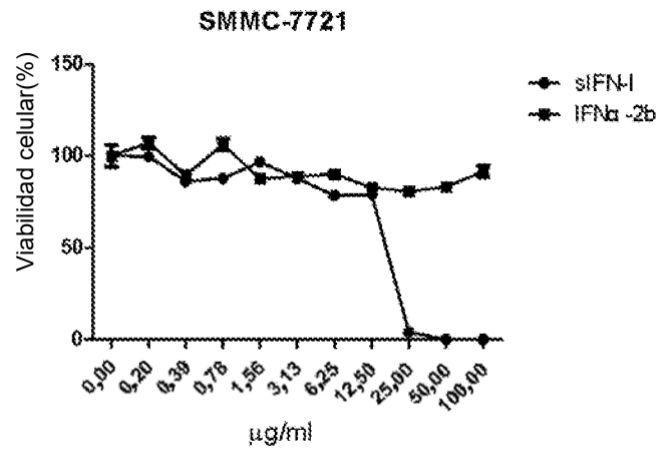


FIG. 5H

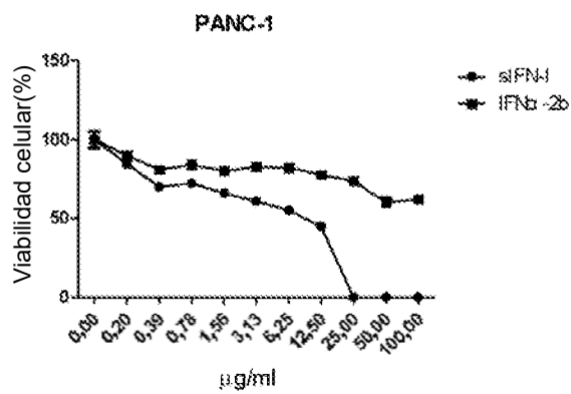


FIG. 5I

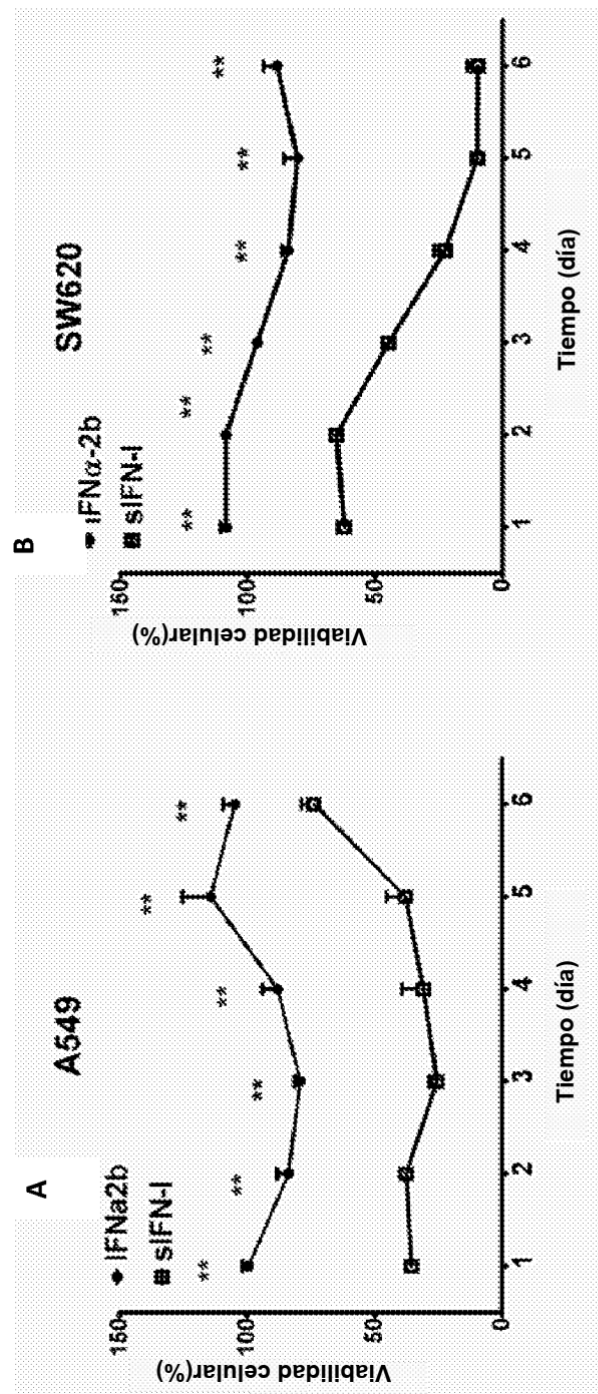


FIG. 6

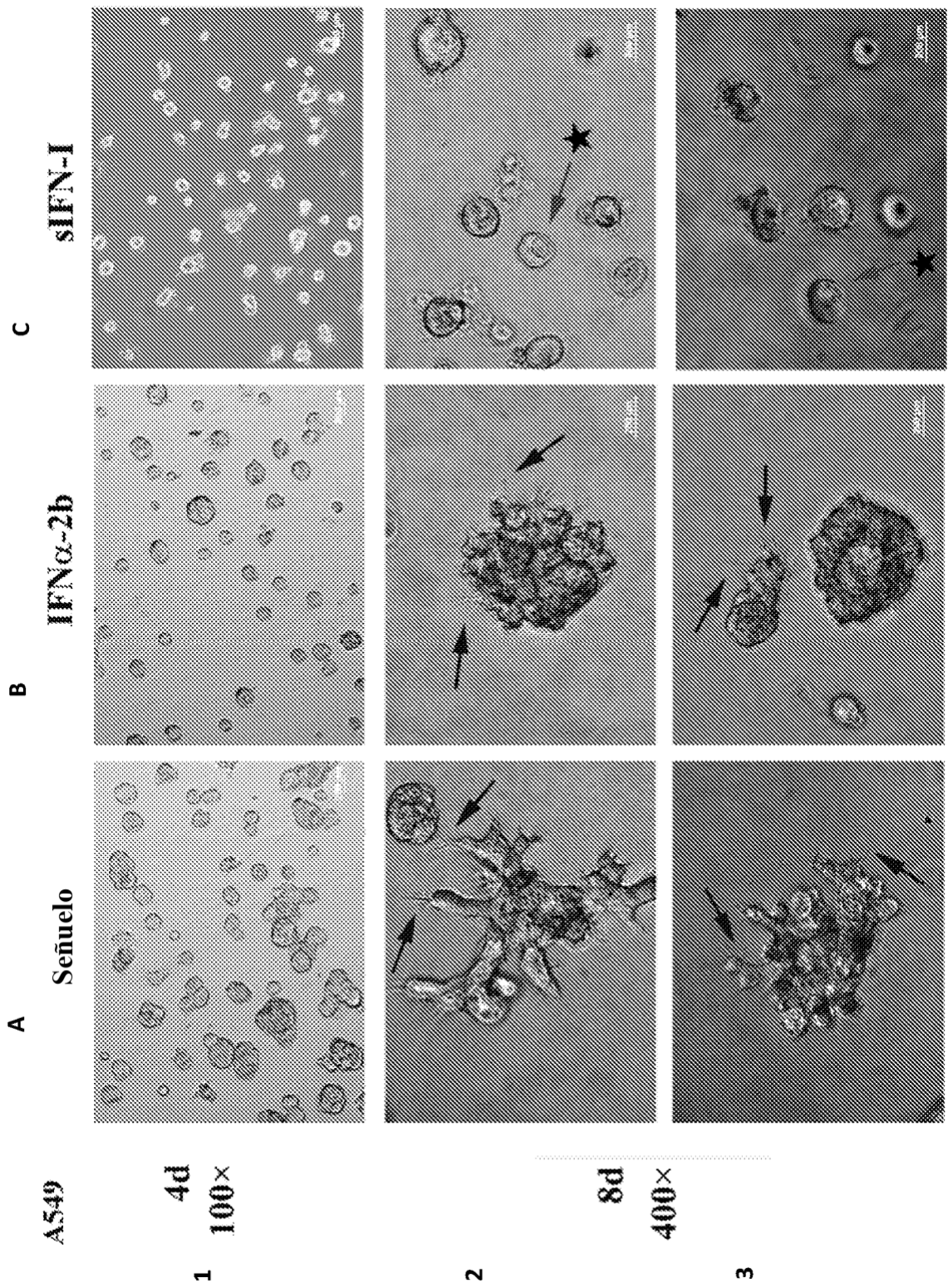


FIG. 7

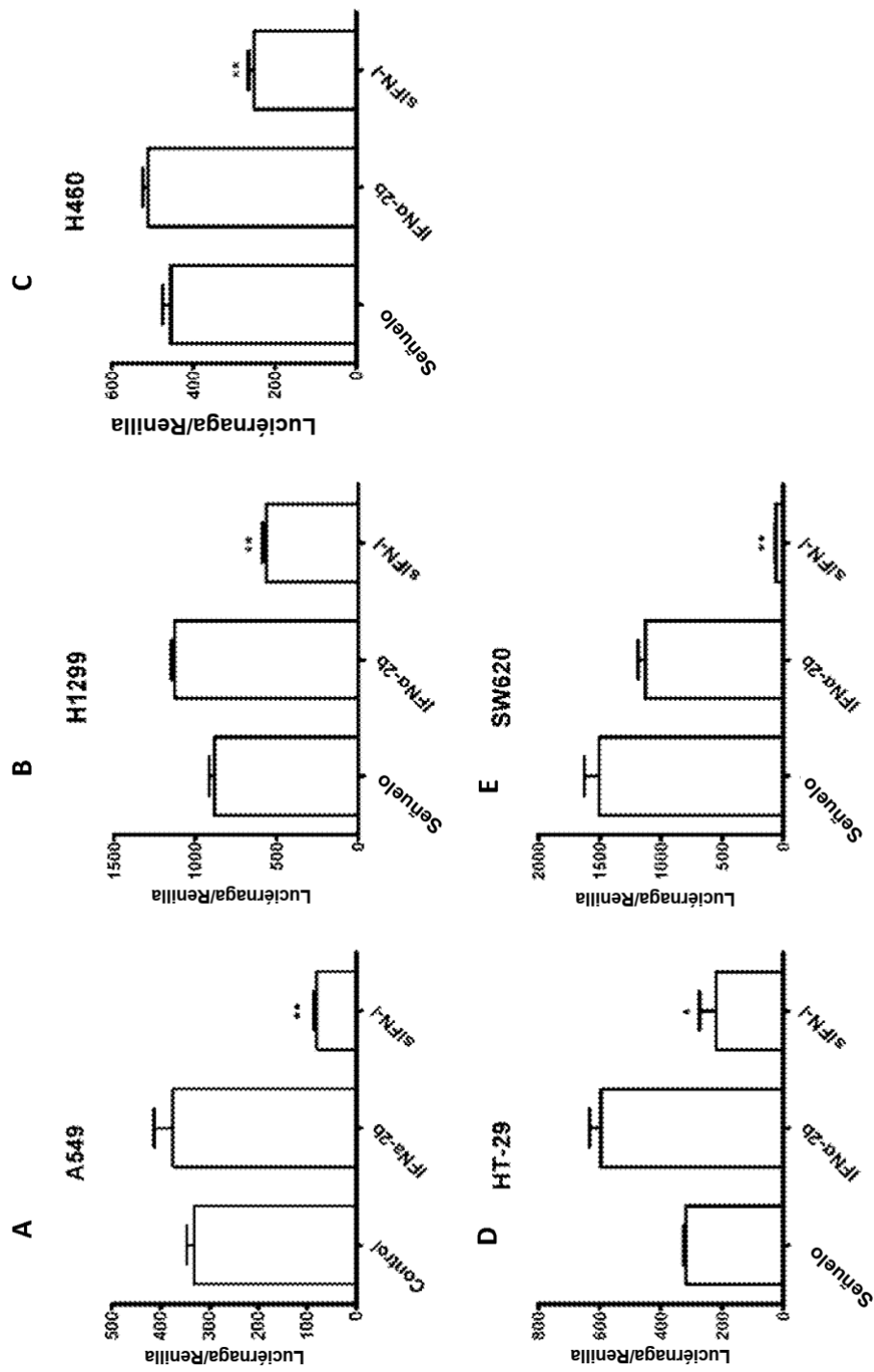


FIG. 8

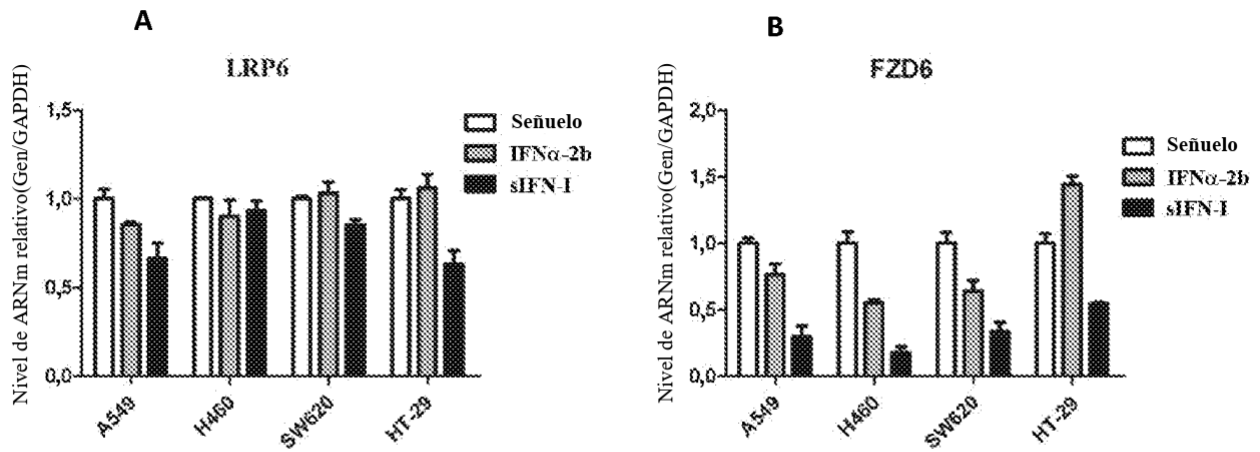
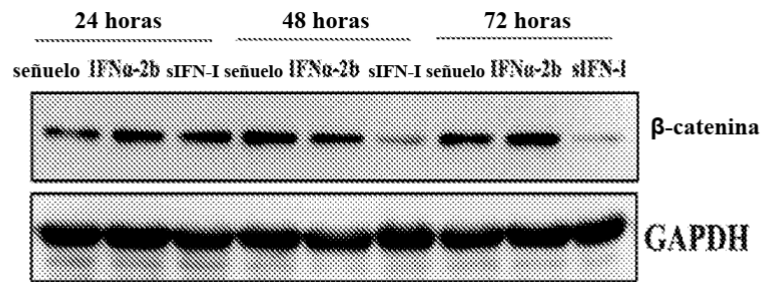


FIG. 9

A549



SW480

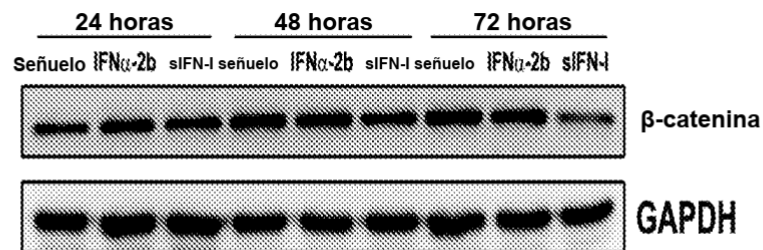


FIG. 10

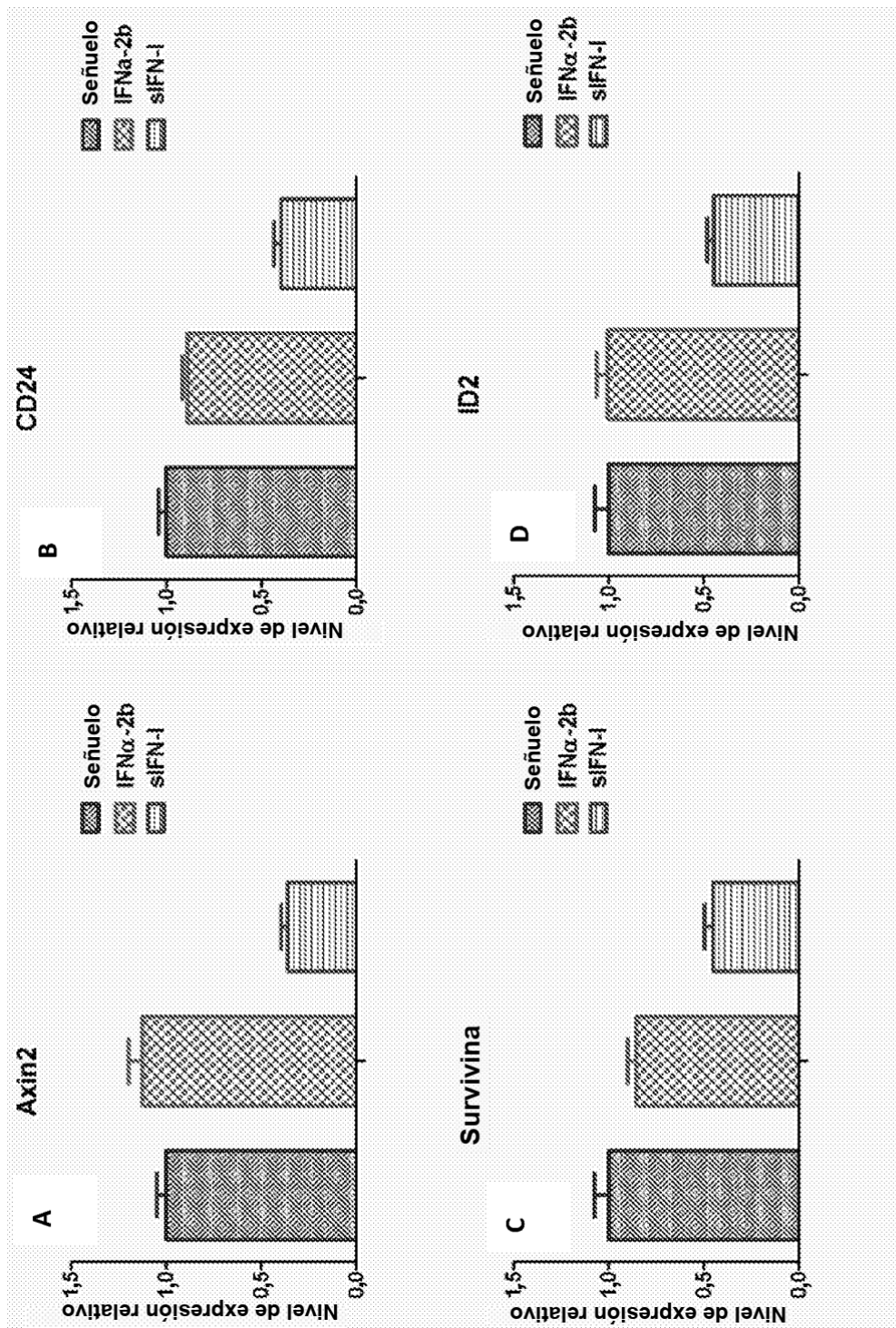


FIG. 11

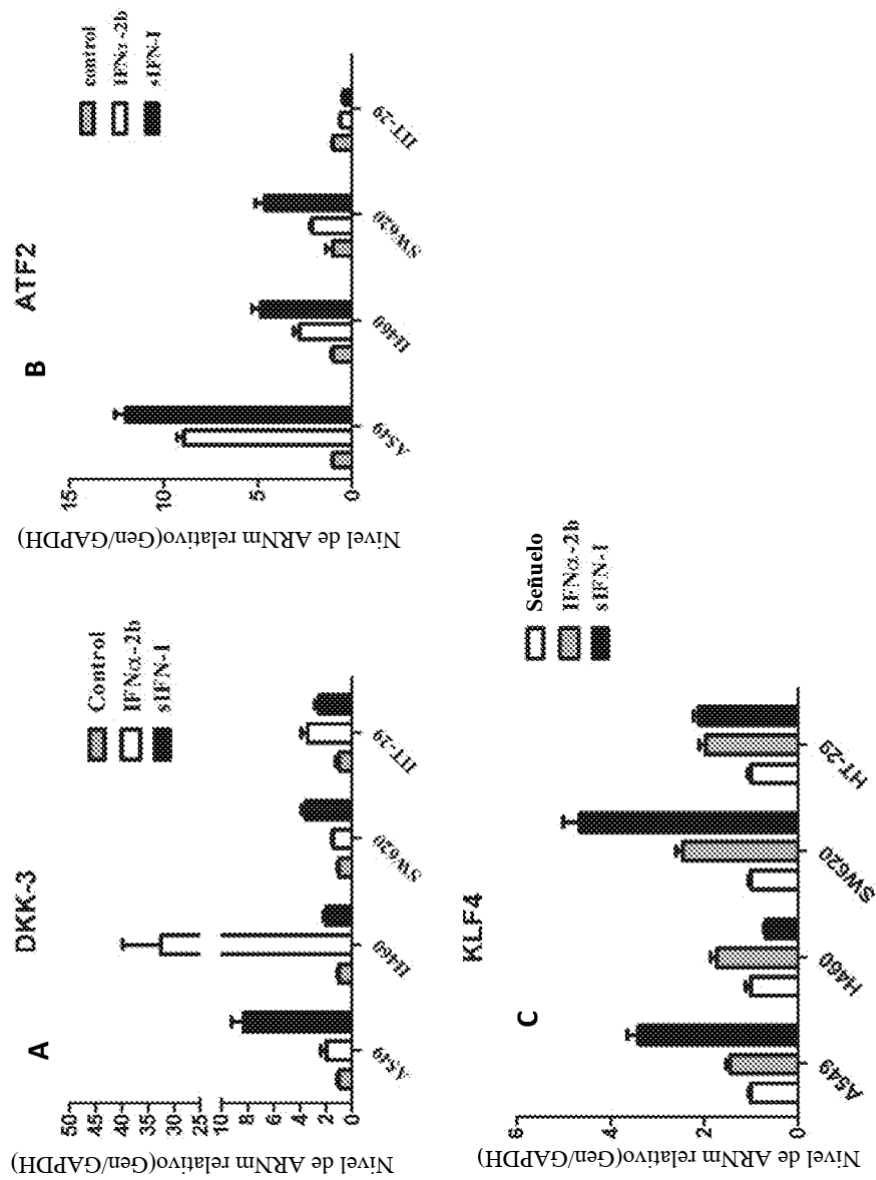


FIG. 12

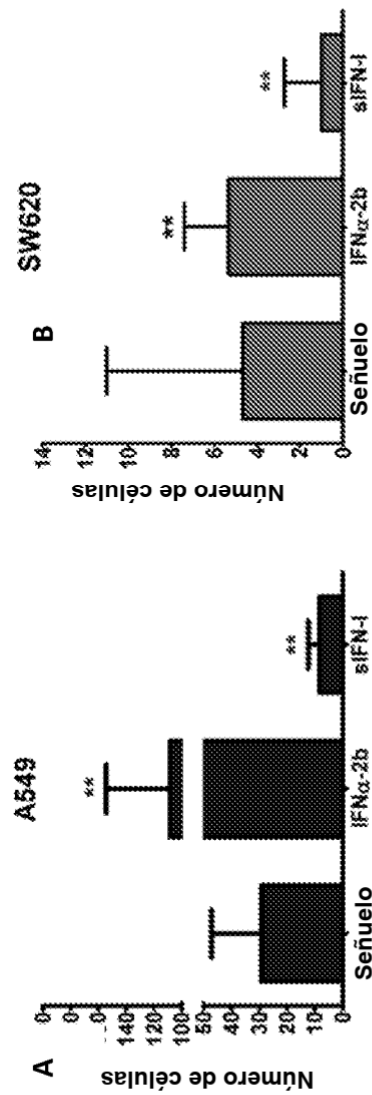


FIG. 13

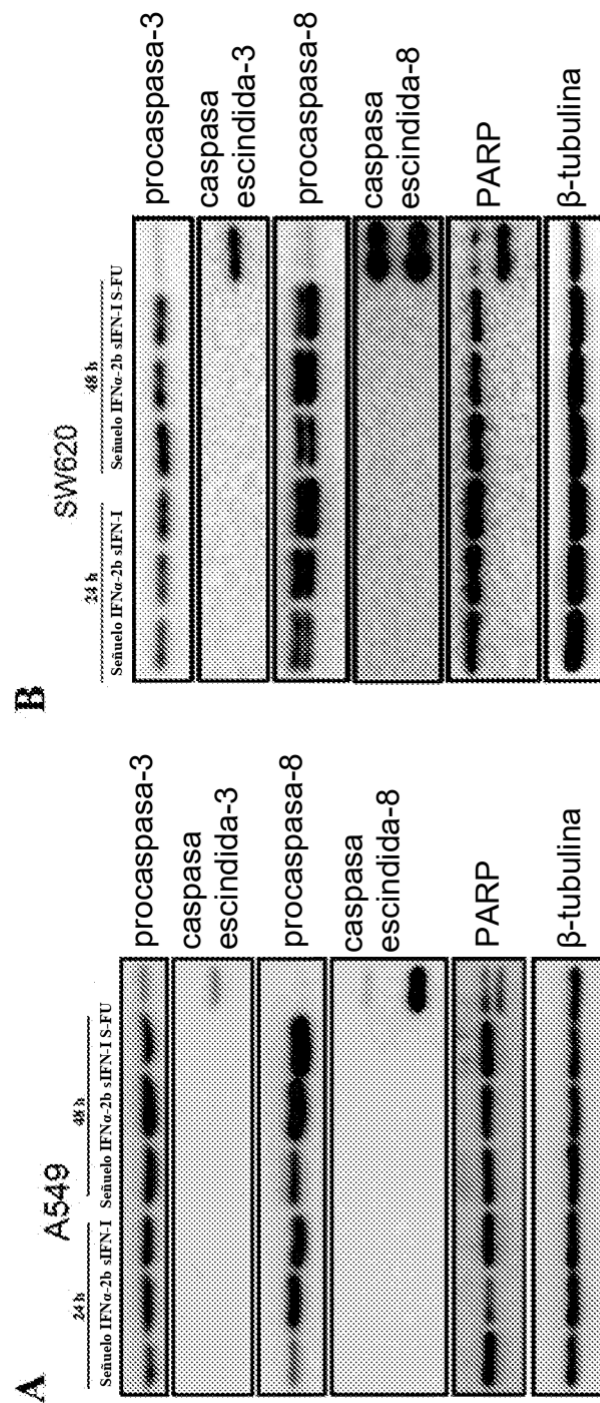


FIG. 14

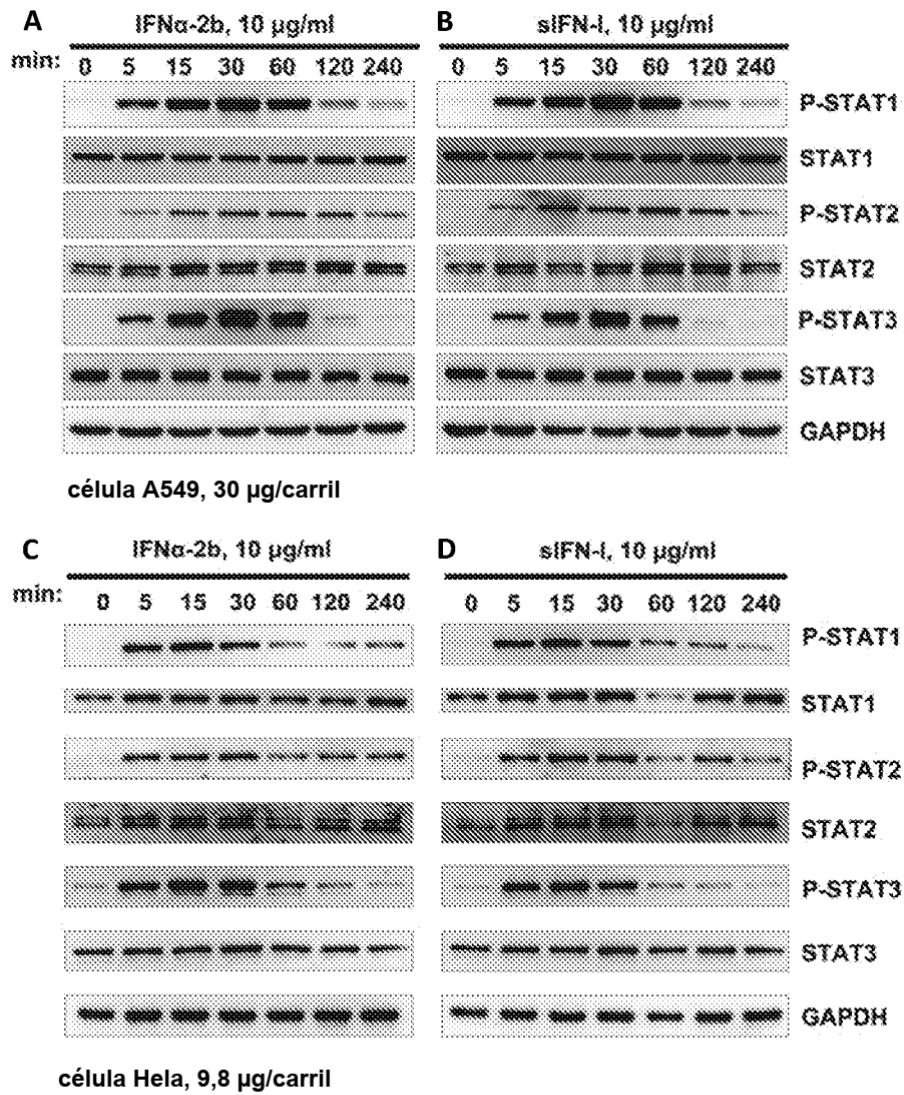


FIG. 15

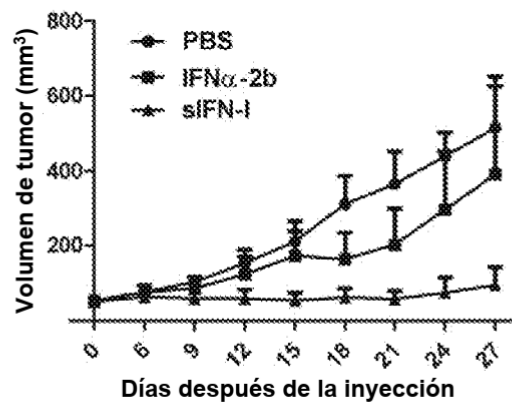


FIG. 16