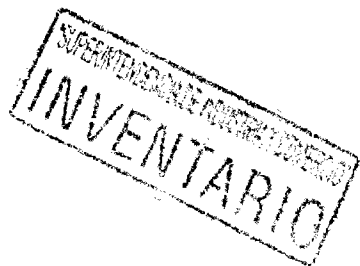




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Of

Organizacion CSA Ltda



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

00-34693

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO "Metodo para el tratamiento de la familia de Tumores de Ewing"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL AGIK^{38/19}

71. SOLICITANTE 1.-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), 2.-Institut Curie, 3.-BIO SIDUSSA.

DOMICILIO 1.-, 2.- FRANCIA, 3.- ARGENTINA.

74. APODERADO Humberto RUBIO CAMACHO

MAY 15 2000

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

707038

24



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



00 34695

IDL

ED

ION

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00034695 00000000

Folios: 35

Fecha (AMD): 2000-05-15 10:53:21

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

1.- Institut National de la Santé et de la
Recherche Medicale (INSERM)

2.- Institut Curie, 3.- BIO SIDUS S.A.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

1.-, 2.- FRANCIA, 3.- ARGENTINA

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

1.-, 2.- París, 3.- Buenos Aires

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

Dirección y Domicilio

CARRERA 7 No. 74-64 OFICINA 506

Ciudad

Santafé de Bogotá, D.C.

Teléfono 3 13 24 08

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Jeanne WIETZERBIN, Josiane SANCEAU

Identificación

Dirección

FRANCIA

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

"METODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FAMILIA DE TUMORES
DE EWING"

INDICADA

SI ☐ NO ☒

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(32) Fecha

(31) No. Solicitud

☐ 12 meses

☐ 18 meses

a partir de la fecha de la presente solicitud

ONAL

A61K38/19⁽⁶⁾

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención se refiere un método para el tratamiento de los tumores de la familia Bwing mediante el uso de interferón beta. Se describe un método para la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de interferón beta a un mamífero afectado de un tumor de la familia de Bwing. La presente invención además se refiere a los compuestos farmacéuticos adecuados para la administración a mamíferos para el tratamiento de los tumores de la familia de Bwing que comprende interferón-beta en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un transporte aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☐
Fotocopia del memorial de protocolización del Poder de BIO SILEUS S.A., bjo el No. 00-004017	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA



NOMBRE Humberto RUBIO CAMACHO

CC. 17.192.062 de Bogotá

**HUMBERTO RUBIO & CIA.
ABOGADOS**

Carrera 7 No. 74-64 Oficina 506
Teléfonos 3 13 24 08 - 313 24 10 - 313 24 23 - 313 17 59
Fax: (571) 313 16 47 - 313 23 67
Email: rubiolaw@openwa-
Apartado Aéreo 211
Santafé de Bogotá, D.C.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00004017 00000000 Folios: 5
Fecha (AMD): 2000-01-26 11:13:27
Inasite : 332 ENTERANTE 401 PRES-GRD
Dependencia: 2010 DIVISION DE SIGNOS DISTINTIVOS

Señor

**SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE SIGNOS DISTINTIVOS**

E. S. D.

DESTINO: 198

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, vecino de Santafé de Bogotá, en donde estoy cedulado bajo el número 17 192.062, Abogado en Ejercicio portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 del Consejo Superior de la Judicatura, atentamente presento a su Despacho el poder debidamente legalizado hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores, que me confirió la Sociedad BIO SIDUS S.A., domiciliada en Constitución 4234 (1254) Buenos Aires, República de Argentina; para que la asista en todo lo referido con registros, renovaciones, traspasos, mantenimiento, obtención y protección de todo lo relacionado con la Propiedad Industrial, contestar todos los reclamos y demandas presentadas, desistir de dichos procedimientos, sustituir este poder, recibir notificaciones y demás pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado.

La prueba de la existencia de la Sociedad BIO SIDUS S.A., aparece incita en en el poder otorgado.

Con todo respeto ruego a Usted se sirva ordenar que se **PROTOCOLICE** e inscriba en esa Superintendencia el citado poder, tomando nota de mi dirección, Carrera 7 No. 74 - 64 Oficina 506, teléfonos 3 132408 - 3 132410 - 3131759, Santafé de Bogotá.

Atentamente,

**Original Firmado
Por Humberto Rubio**

HUMBERTO RUBIO CAMACHO
C.C. 17.192.062 de Bogotá
T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura
COD. 4134



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

REGISTRO
PATENTE DE INVENCION
"METODO PARA EL TRATAMIENTO
DE LA FAMILIA DE TUMORES DE
EWING"

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 17,847
FECHA : MARZO 14 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00034595 00000000 Folios: 25
Fecha (AMD): 2000-03-15 10:50:21
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
TINIKE STOL	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	958704	2,739,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Método para el Tratamiento de la Familia de Tumores de Ewing

Descripción Técnica de la Invención

Método de tratamiento de la familia de tumores de Ewing. En particular, método de tratamiento de la familia de tumores de Ewing en mamíferos utilizando interferón beta.

Campo Técnico de la Invención

La presente invención se refiere a refiere al uso de interferón beta para el tratamiento de la familia de tumores de Ewing en mamíferos.

Estado de la Técnica

Los tumores de Ewing representan el segundo tipo de tumores óseos más común observado en niños luego del osteosarcoma. La familia de tumores de Ewing incluye al sarcoma de Ewing (EWS o tumor óseo de Ewing), Ewing Extra-Oseo (EOE), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET o neuroepitelioma periférico) y los tumores de Askin (TNEP de la pared torácica). Estos tumores son enfermedades poco comunes en los que las células malignas se encuentran en el hueso y tejidos blandos, y los protocolos más recientes emplean el mismo tratamiento para esta familia de tumores. EWS se observa mayormente en adolescentes y adultos jóvenes, y los sitios más comunes de lesión primaria son los huesos de la pelvis, fémur, húmero y costillas. Se estima que la incidencia del sarcoma de Ewing es de aproximadamente 60% dentro de la familia de tumores de Ewing.

Los estudios que emplean marcadores inmunohistoquímicos, citogenética, genética molecular, y cultivo de tejidos, indican que todos estos tumores derivan de la misma célula *stem* primordial. Los estudios citogenéticos de la familia de tumores Ewing han identificado una alteración consistente del *locus* EWS en la banda q12 del cromosoma 22 que puede involucrar otros cromosomas, incluyendo el 11 o el 21. En forma característica, el amino terminal del gen EWS está yuxtapuesto con el carboxi terminal de otro cromosoma. En la mayoría de los casos (90%), esta translocación

cromosomal dirige la fusión del extremo 5' del gen de EWS, codificando una proteína capaz de participar en el metabolismo del ARN, con el extremo 3' del gen Fli-1, un miembro de la familia del factor de transcripción Ets ubicado en la banda q24 del cromosoma 11. *Ver Delattre et al., Nature 359: 162-165 (1992)*. Varios genes de fusión pueden generarse según los sitios de corte (entre los exones 7 y 11 de EWS y exones 3 a 9 de Fli-1).

La fusión más frecuente, EWS-Fli-1 tipo I, que fusiona el exón 7 del EWS con el exón 6 de Fli-1, representa el 50% de los casos. La fusión tipo II (25% de los casos) liga el exón 7 de EWS con el exón 5 de Fli-1. Además de estos dos tipos principales de fusión, se han descrito aproximadamente otras diez combinaciones.

En ciertos casos de tumor de Ewing, EWS no se fusiona a Fli-1 sino a otro miembro de la familia Ets, ej. FEV. Otros miembros de la familia Ets que pueden combinarse con el gen EWS son ERG (ubicado en el cromosoma 21), ETC (ubicado en el cromosoma 7), y E1AF (ubicado en el cromosoma 17), que dan como resultado las siguientes translocaciones: t(21;22), t(7;22) y t(17;22), respectivamente.

Estas alteraciones genéticas resultan en una consecuencia bioquímica constante: las células de Ewing siempre expresan una proteína quimérica con la región N-terminal de EWS fusionada a un dominio de pegado a ADN de la familia proteica Ets. Esta constancia sugiere que esta fusión ejerce un papel central en el desarrollo del tumor de Ewing.

Se ha demostrado experimentalmente el papel de la proteína de fusión EWS/Fli-1 en el sarcoma de Ewing. Esta proteína puede transformar fibroblastos de ratón, y estas células son capaces de generar tumores en ratones desnudos.

A partir de experimentos *in vitro*, se demostró que la proteína EWS/Fli-1 podía activar la transcripción de ciertos genes en forma más eficiente que Fli-1. Este hecho sugiere que la proteína de fusión EWS/Fli-1 ejerce sus acciones oncogénicas a través de la activación anormal de ciertos genes celulares.

Se demostró que la proteína PU-1, también perteneciente a la familia Ets, está implicada en el control de la expresión regulada de los genes de interferón y citoquinas. *Ver Pérez et al., Mol. Cell Biol. 14: 5023-5031 (1994)*.

Los factores predictivos de la familia de tumores de Ewing incluyen el sitio y volumen del tumor primario y la condición de enfermedad metastásica. El tamaño del tumor también se considera como una variable importante. Con el tratamiento actual, los estudios sugieren que el 50%-70% de los pacientes sin enfermedad metastásica

tienen una sobrevida libre de enfermedad a largo plazo, comparado con sólo el 20%-30% para los pacientes que presentan enfermedad metastásica. Por tal motivo, aún existe una necesidad aguda en el arte de un método eficaz de tratar a la familia de tumores de Ewing.

Descripción de la Invención

La presente invención describe un método efectivo de tratar la familia de tumores de Ewing en mamíferos. También se enumeran otras características y ventajas de la presente invención en la descripción detallada de los enfoques preferidos.

Rosolen y otros han informado que el tratamiento de una línea celular derivada de un sarcoma de Ewing con interferón alfa induce una inhibición del crecimiento celular *in vitro*. Ver Rosolen *et al.*, *Mod. Pathology*, 10: 55-61 (1997). Los inventores de la presente invención demuestran que el interferón beta (IFN beta) exhibe una acción antiproliferativa sobre el sarcoma de Ewing. El IFN beta se une al mismo receptor que el interferón alfa (IFN alfa), pero induciendo diferentes procesos y actividades. Ver Runkel *et al.*, *J. of Biol. Chem.*, 14: 8003-8008.

Los inventores de la presente invención también demuestran, más específicamente, que la acción antiproliferativa de IFN beta sobre las células derivadas del sarcoma de Ewing *in vitro* fue distintivamente superior que la observada para IFN alfa.

Un enfoque de la presente invención se dirige a un método para tratar tumores de Ewing en mamíferos, que comprende la administración a un mamífero que requiera dicho tratamiento, de una cantidad terapéuticamente eficaz de IFN beta. Un segundo enfoque de la presente invención está dirigido a un compuesto adecuado para su administración a un mamífero para el tratamiento de los tumores de la familia Ewing que comprenda IFN beta en una cantidad terapéuticamente eficaz, junto con excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Las descripciones generales antes mencionadas y la siguiente descripción detallada son ejemplificadoras y explicativas de las maneras de llevar a cabo la invención.

Salvo indicación en contrario, los términos técnicos o científicos empleados en la presente descripción tienen el significado que entiende habitualmente una persona normalmente versada en la materia técnica relacionada.

Tal como se emplea en la presente descripción, “familia de tumores de Ewing” significa un tipo de tumor hallado en tejidos óseos y blandos caracterizados por pequeñas células redondas y asociadas con una alteración del locus EWS en el cromosoma 22. La familia de tumores incluye el sarcoma de Ewing (tumor óseo de Ewing o ETB), tumor extraóseo de Ewing (EOE), tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos (PNET o neuroepitelioma periférico) y tumores de Askin (PNET de la pared torácica).

Las células individuales del sarcoma de Ewing y EOE contienen núcleos redondos a ovales con cromatina dispersa delgada sin nucleolos. Ocasionalmente, las células con núcleos más pequeños, más hipercromáticos (y probablemente degenerativos) y observan un patrón “célula clara-célula oscura”. El citoplasma varía en cantidad, pero es convencionalmente claro y contiene glicógeno, que puede ser resaltado con una tinción de ácido periódico-Schiff (PAS). Las células tumorales se ven estrechamente empacadas y crecen siguiendo un patrón difuso sin evidencia de organización estructural.

El aspecto histológico de PNET difiere en cierta forma del sarcoma de Ewing y del EOE. Estos tumores están típicamente compuestos por células hipercromáticas redondas a ovoides con citoplasma mínimo. Las células tumorales se disponen típicamente en nichos y trabéculas con formación variable de rosetas. Las rosetas pueden tener un lumen central, pero con frecuencia son pobremente definidas, componiéndose de células tumorales dispuestas alrededor de un espacio vacío. El patrón clásico de crecimiento lobular se aprecia mejor con baja energía, y difiere del clásico crecimiento difuso observado en EOE. Ocasionalmente, se observan grupos de células redondas, citológicamente uniformes, con cromatina dispersa que se asemejan a las del EOE, en forma entremezclada, características de PNET. Esta superposición de características da mayor sustento al concepto de que estos tumores son en realidad el mismo tumor con un espectro de diferenciación.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “mamífero” indica toda especie de mamífero, e incluye, aunque no se limita a, conejos, ratones, perros, gatos, primates y humanos, preferentemente, se refiere a humanos.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “tratamiento” se refiere a todo proceso, acción, aplicación, terapia o similar, en la que un mamífero, incluyendo a un ser humano, esté sujeto a asistencia médica con el objeto de mejorar la condición del mamífero, ya sea directa o indirectamente. En el contexto del crecimiento de un tumor o del crecimiento de células tumorales, “tratamiento” incluye, aunque no se limita a, la inhibición y a la prevención de la condición.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “inhibición” puede comprobarse por la aparición demorada de tumores primarios o secundarios, lento desarrollo de tumores primarios o secundarios, menor ocurrencia de tumores primarios o secundarios, menor gravedad o disminución de efectos secundarios de la enfermedad, interrupción del crecimiento del tumor y regresión de tumores, entre otros. Preferentemente, la inhibición del tumor es completa.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “prevención” significa ausencia de tumor o de crecimiento de células tumorales en caso de no existir el tumor previamente, y falta de aparición posterior de tumores o de crecimiento ulterior de células tumorales en los casos en que ya se hubiera producido crecimiento.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “tratamiento terapéutico” indica tratar a un sujeto una vez que éste ha contraído la enfermedad, e incluye la terapia profiláctica.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “cantidad efectiva” significa una cantidad efectiva para llevar a cabo la función especificada. Una “cantidad terapéuticamente efectiva”, en referencia al tratamiento de un tumor, se refiere a una cantidad suficiente para producir uno o más de los siguientes resultados: reducir el tamaño del tumor, inhibir la metástasis del tumor, inhibir el crecimiento del tumor, evitar el crecimiento del tumor, aliviar la molestia causada por el tumor o prolongar la vida de un paciente que padece el tumor.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “interferón” significa la familia de proteínas y glicoproteínas citoquinas altamente homólogas, poseyendo actividades biológicas múltiples, tales como actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora, al menos en las especies de animales de las que dichas sustancias son derivadas.

En la actualidad, los interferones han sido categorizados en cinco tipos diferentes; IFN alfa (IFN leucocitario), IFN beta (IFN de fibroblastos), IFN gamma

(IFN inmune), IFN omega e IFN tau (factor trofoblástico). Los detalles de las relaciones de homología de las proteínas IFN son conocidos. Ver Viscomi, *Biotherapy* 10: 59-86 (1997).

Tal como se emplea en la presente descripción, los términos “interferón beta” e “IFN beta ” incluyen todas las proteínas, polipéptidos y péptidos que sean IFN betas naturales o recombinantes, o derivados de los mismos, y que se caracterizan por la actividad biológica de dichos IFN betas contra enfermedades malignas, no malignas o virales. Estos incluyen compuestos del tipo IFN beta de una variedad de orígenes tales como IFN betas naturales (humano y no humano), IFN betas recombinantes e IFN betas sintéticos o semi-sintéticos.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “interferón beta recombinante” se refiere al IFN beta producido por técnicas de ADN recombinante, como por ejemplo, mediante el uso de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica para el polipéptido de IFN beta.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “Unidad Internacional” significa la unidad de potencia internacionalmente establecida de medida de IFN tal como lo define la Conferencia Internacional para la Unificación de Fórmulas y según es reconocida por aquéllos versados en el arte.

Tal como se emplea en la presente descripción, el término “transporte farmacéuticamente aceptable” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la terapia. Incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o retardadores de la absorción, o sustancias similares. El uso de dichos medios y agentes en la administración de sustancias activas farmacéuticas es conocido en el arte. Salvo en la medida en que algún medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. Los principios activos suplementarios también pueden ser incorporados a los compuestos de la invención. Se dice que un compuesto es “farmacológicamente aceptable” si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor.

Tal como se emplea en el presente, “simultáneo o secuencial” significa que el IFN beta es co-administrado con otra citoquina o agente quimioterápico o junto con radioterapia o cirugía o cuando la administración de IFN beta está precedida o seguida por un tratamiento que no sea IFN beta. En los casos en que se produzca una terapia

“secuencial”, la diferencia de tiempo entre la administración de IFN beta y el tratamiento sin IFN beta puede ser minutos, horas, días, semanas o meses dependiendo del tumor o sarcoma que se esté tratando, el mamífero que esté siendo tratado y la eficacia del tratamiento en forma global.

El término “substancialmente en forma simultánea” significa “aproximadamente en el mismo momento” siendo la única limitante que ambas sustancias deberán estar presentes conjuntamente en el sitio del tumor.

Conforme con la presente invención, se ha descubierto que el IFN beta puede inhibir o evitar en forma significativa el crecimiento del tumor en el sarcoma de Ewing. Como tal, en un enfoque de la invención, se ofrece un método de tratamiento de la familia de tumores de Ewing en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de IFN beta a dicho mamífero.

En un enfoque preferencial, el IFN beta es IFN beta recombinante. Por ejemplo, el IFN beta 1a (tal como el comercializado bajo la marca de fábrica REBIF® por Ares-Serono o AVONEX® por Biofen, que son IFNs recombinantes glicosilados producidos en células de mamíferos, o IFN beta 1b (tal como el comercializado bajo las marcas de fábrica BETASERON® por Schering AG o BETAFERON® por Berlex/Chiron). Más preferentemente, se utiliza el IFN beta 1a recombinante glicosilado.

También puede utilizarse un IFN beta natural extractivo en la presente invención así como el comercializado bajo la marca de fábrica FRONE® por Ares-Serono. El IFN beta humano natural puede purificarse a partir de varias fuentes celulares que incluyen leucocitos aislados de sangre entera, fibroblastos de neonatos, líneas celulares linfoblastoideas y varias líneas celulares de leucemia. El IFN beta también puede ser extraído de mamíferos tal como un IFN beta de rumiante o bovino. Como tal, el IFN beta empleado puede ser “homólogo” al mamífero a ser tratado, lo que significa que tiene el mismo origen que la especie de mamífero a ser tratado (ej. IFN beta humano para el tratamiento de un humano o IFN beta murino para el tratamiento de un ratón) o puede ser “heterólogo” al mamífero a ser tratado, lo que significa que el origen de especie del IFN beta y la especie del mamífero son diferentes (ej. IFN beta humano para el tratamiento de un ratón o IFN beta murino para el tratamiento de un ser humano).

El IFN beta del método reivindicado también incluye, por ejemplo, secuencias conocidas y aquellas variantes cuyos genes son caracterizados por un alto grado de

homología con la secuencia conocida y que codifican para IFN beta biológicamente activo y compuestos que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que las formas conocidas de IFN beta. El IFN beta también puede contener únicas o múltiples inserciones, deleciones o agregados de aminoácidos respecto de los de la secuencia natural o puede ser un fragmento proteico que incluya el sitio activo del IFN beta.

En general, toda molécula de IFN beta se ve encuadrada en la presente invención y se incluye en la expresión "IFN beta" siempre que dichas moléculas tengan el efecto de evitar o reducir el tamaño de la familia de tumores de Ewing *in vitro*, en un animal de laboratorio *in vivo* o en un mamífero a ser tratado.

La presente invención se ejemplifica por el efecto del IFN beta contra los tumores del sarcoma de Ewing en ratones. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención se extiende a los efectos *in vivo* del IFN beta en todos los mamíferos tales como humanos, y a todos los tumores de la familia de tumores de Ewing. Preferentemente, el mamífero al cual se aplica la presente invención es humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, animales de valor ganadero, tales como vacas, cerdos, ovejas, caballos, cabras, animales de compañía tales como gatos y perros, y animales de laboratorio tales como ratones, conejos, cobayos o hámsters.

Conforme a la presente invención, el IFN beta puede administrarse por una vía adecuada tal como oral o parenteral, es decir, cualquier vía que no sea el tracto alimentario. Preferentemente, la administración parenteral es por vía intravenosa (dentro o en una vena), intramuscular (dentro de un músculo), subcutánea (introducido por debajo de la piel) o percutánea (efectuada a través de la piel). Es preferible una inyección sistémico en la que el IFN beta ingrese al torrente sanguíneo, aunque puede también ser altamente ventajoso una inyección directa en el tumor.

La administración puede ser en dosis única o dosis repetidas una o más veces luego de un cierto período. Cuando se administra IFN beta por inyección, la administración puede ser por inyecciones continuas, o en bolo único o bolos múltiples. Los modos de administración y posología pueden ser determinadas por los versados en el arte conforme a los criterios generalmente aceptados para un tratamiento terapéutico adaptado a un paciente. Como tales, la dosis del agente administrado variará dependiendo de factores tales como edad del paciente, su peso, altura, sexo, condición médica general, historia médica previa, etc.

La cantidad eficaz de IFN beta dependerá del mamífero y de la condición a ser tratada. En general, es deseable administrar al receptor una dosis en el rango de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 90×10^6 Unidades Internacionales (UI), aunque pueden administrarse dosis menores o mayores. Preferentemente, puede administrarse una dosis en el rango de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 45×10^6 UI. Los profesionales adiestrados deben ajustar el tiempo y dosis de acuerdo a los síntomas clínicos del paciente y según se indica en la literatura médica: La composición de IFN beta puede ser administrada sola o formulada con transportadores farmacéuticamente aceptables, ya sea en dosis única o múltiple. Como tales, en otro enfoque de la invención, el IFN beta puede administrarse como parte de un compuesto farmacéutico que comprende un transporte farmacéuticamente aceptable.

Los transportes farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no se limitan a, diluyentes o rellenos sólidos inertes, soluciones acuosas estériles, y varios solventes orgánicos no tóxicos. Los transportes farmacéuticamente aceptables deben ser inertes. Además, el transporte no deberá reaccionar con, ni de ninguna otra forma reducir la eficacia de, los ingredientes activos, y más particularmente, no deberán disminuir en forma significativa la eficacia o estabilidad del IFN beta. Los transportes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, polietilenglicol, aceite mineral, petrolatum, propilenglicol, lanolina y agentes similares.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la formulación deberá ser estéril y deberá ser fluida en la medida en que posibilite una forma fácil de dispensar en jeringa. También debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

La composición de IFN beta puede administrarse sola o puede ser administrada en forma simultánea o secuencial en combinación con cualquier agente farmacéutico, tal como otro agente eficaz contra el sarcoma de Ewing. En esta "terapia combinada", el IFN beta puede administrarse con otras citoquinas, agentes terapéuticos, protocolo radioterapéutico, cirugía o una combinación de ellos. Dichas citoquinas incluyen, aunque no se limitan a, interleuquina-1, TNF alfa, IFN alfa o interferón gamma. Los agentes terapéuticos representativos son bien conocidos en el

arte e incluyen, aunque no se limitan a, Doxorubicina, Actinomicina, Ciclofosfamida (VAdriaC), Etoposide, Ifosfamida y Vincristina.

Las cantidades de las otras citoquinas deben ser similares a las cantidades efectivas de IFN alfa. Las cantidades efectivas de agentes quimioterapéuticos variarán dependiendo del agente y son conocidas en el arte. Los compuestos en cuestión pueden ser administrados ya sea conjuntamente con las modalidades de segundo tratamiento o en forma separada, es decir, en diferentes momentos o en diferentes jeringas o comprimidos.

En ciertos casos puede emplearse la cirugía para tratar de eliminar el cáncer y parte del tejido que lo circunda. La cirugía también podrá usarse para eliminar todo resto de tumor que quede luego de la quimioterapia o radioterapia. Preferentemente, el compuesto de IFN alfa se administra en combinación con terapia quirúrgica, más preferentemente luego del procedimiento quirúrgico.

Otro enfoque de la presente invención comprende además la administración sustancialmente simultánea o secuencial de uno o más de otras citoquinas, derivados de las mismas o uno o más agentes quimioterápicos, o el tratamiento simultáneo o secuencial por radioterapia. Consecuentemente, el IFN beta puede ser administrado conjuntamente con otra citoquina u otro agente quimioterapéutico o junto con radioterapia o en los casos en que la administración de IFN beta está precedida o seguida por tratamiento sin uso de IFN beta. En los casos en que se produce una terapia "secuencial", la diferencia de tiempo entre la administración de IFN beta y el tratamiento sin IFN beta puede ser minutos, horas, días, semanas o meses dependiendo del tumor o sarcoma que se esté tratando, el mamífero tratado y la eficacia del tratamiento global.

La presente invención se refiere además al uso de IFN beta o de un fragmento activo, mutante o derivado del mismo, sólo o conjuntamente con una o más de otras citoquinas o agentes quimioterapéuticos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes con tumores o sarcomas pertenecientes a la familia de tumores de Ewing.

La presente invención también se refiere a un proceso para preparar el compuesto farmacéutico antes mencionado caracterizado por mezclar, conforme a los métodos conocidos, principios activos con excipientes aceptables que sean aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

En todos los casos antes mencionados, la presente invención también se extiende al uso de derivados de IFN beta y derivados de otras citoquinas o agentes quimioterapéuticos. Se entiende por “derivado” a las formas recombinante, química u otra forma sintética de IFN beta u otras citoquinas o agentes quimioterapéuticos o toda alteración tal como agregado, sustitución o delección a los componentes de la secuencia de aminoácidos de la molécula, siempre que el derivado posea la capacidad de prevenir o inhibir los tumores de Ewing.

La presente invención se extiende además a los compuestos farmacéuticos que comprenden IFN beta o sus derivados solos o en combinación con uno o más de otras citoquinas, sus derivados, agentes quimioterapéuticos y uno o más transportes o diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Los autores de la presente invención también han establecido que el IFN beta media la apoptosis vía inducción de IRF-1 y de la activación de caspasa-7.

Estos resultados ofrecen un fundamento para un método de control de la sensibilidad de las células del sarcoma de Ewing a la apoptosis, mediada por el IFN beta, siguiendo la expresión o activación proteolizada de caspasa-7. Este método puede ser particularmente ventajoso para comprobar la sensibilidad de un paciente al tratamiento con IFN beta, por ejemplo analizando muestras quirúrgicas de tumores de Ewing.

Este análisis de la activación de caspasa-7 puede ser llevado a cabo mediante cualquier método estándar conocido por una persona normalmente versada en la materia técnica.

Preferentemente, se utiliza un inmunoensayo de caspasa-7 por medio de un anticuerpo dirigido contra esta proteína. También puede detectarse o cuantificarse el ARNm que codifica para esta caspasa.

Habiendo descripto en términos generales la invención, la misma será más fácilmente comprendida haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se ofrecen a modo de ilustración, y que no tienen la intención de ser limitantes de la presente invención, a menos que así se especifique.

Diagramas

La Fig. 1 representa el porcentaje de inhibición de crecimiento de líneas celulares tratadas con IFN beta, alfa o gamma, en igual concentración.

La Fig. 2 representa el porcentaje de inhibición de crecimiento de células EW-7 tratadas con dosis incrementales de IFN beta, alfa o gamma.

La Fig. 3 representa el efecto de IFN beta sobre el desarrollo del tumor de Ewing causado por inyección subcutánea de células EW-7 a ratones. Se midieron los volúmenes relativos del tumor (VRT) con respecto al tiempo.

La Fig. 4 muestra un gráfico de tasa de crecimiento de los tumores de Ewing en ratones desnudos luego de la inyección con IFN beta. Se representa el valor promedio de los volúmenes relativos de los tumores (VRT) de 12 ratones.

La Fig. 5 representa el efecto del IFN beta sobre tumores de Ewing crecidos en ratones desnudos. Los volúmenes de tumor fueron determinados dos veces por semana para cada grupo, y se determinó la mediana del volumen.

La Fig. 6 representa la cuantificación de células apoptóticas en líneas celulares derivadas de sarcoma de Ewing. Las cuatro líneas celulares ES fueron estimuladas con IFN beta. Transcurridas 48 y 72 horas, los núcleos fragmentados fueron detectados usando tinción fluorescente Hoechst 33258 sobre las células cosechadas. La fragmentación nuclear se evaluó contando las células apoptóticas en las poblaciones totales de células no tratadas y tratadas con IFN, respectivamente. Los porcentajes de células apoptóticas son la media de tres experimentos independientes, luego de dos lecturas por parte de dos investigadores, para cada una de las cuatro líneas celulares.

La Fig. 7 muestra los efectos de IFN alfa e IFN beta sobre la expresión de la caspasa-1 y la caspasa-7. Las células EW-7, EW-1, COH y ORS fueron tratadas durante 18 horas con IFN alfa e IFN beta. Los extractos totales de las células fueron sometidos a un análisis Western blot. Caspasa-1 y caspasa-7 fueron sucesivamente reveladas con anticuerpos específicos.

Las Figs. 8 y 9 muestran el efecto de IFN beta sobre los tumores de Ewing crecidos en ratones desnudos luego de la inyección de IFN beta. El valor promedio de los volúmenes relativos del tumor (VRT) de 12 ratones y la mediana de los volúmenes fueron determinados cada tres días.

Ejemplo 1

Actividad Antiproliferativa del Interferón Beta sobre Células Derivadas de Tumores de Ewing. Estudio in vitro.

Los interferones (IFNs) alfa y beta (denominados tipo I) y el IFN gamma (tipo II) se emplearon por su actividad antiproliferativa en 5 líneas celulares derivadas de tumores de Ewing primarios (antes de cualquier tipo de tratamiento: EW-7, COH), o recidivas metastizadas (EW-1, ORS, Simon). *Ver Fig. 1.*

La línea EW-1 es una línea de sarcoma de la octava costilla izquierda. Esta línea se derivó de una efusión pleural (metástasis)(exón 7 de EW/exón 5 de Fli). *Ver Melot et al., Hybridoma, 16: 457 (1997).*

La línea celular COH es una línea tumoral de la rodilla con metástasis pulmonar. Esta línea se derivó de un tumor primario antes de aplicar quimioterapia (exón 10 de EW/exón 6 de Fli). *Ver Melot et al., supra.*

La línea EW7 es una línea tumoral de la escápula. Esta línea se derivó de un tumor primario antes de aplicar quimioterapia (exón 7 de EW/exón 6 de Fli).

La línea ORS es una línea celular derivada de un tumor secundario (metástasis) *Ver Melot et al., supra.*

La línea SIMON es también una línea celular derivada de un tumor secundario (metástasis).

Independientemente de la línea celular utilizada, el tratamiento de 24 y 48 horas con IFN gamma o con IFN alfa (400 unidades/ml) da como resultado una baja inhibición del crecimiento, del 10 al 25%.

El tratamiento con IFN beta (REBIF®, IFN beta 1a recombinante glicosilado, 400 unidades/ml) es más efectivo que el tratamiento con IFN alfa o IFN gamma. Este tratamiento resulta en una inhibición del crecimiento mayor al 50% independientemente de la línea celular utilizada, luego de 24 horas de activación. En el caso de la línea EW-7, la inhibición es de 70%. *Ver Fig. 1.*

Tal como se muestra en la Figura 2, esta diferencia de la actividad antiproliferativa entre los tres IFNs no depende de la dosis de IFN usada. Las células EW-7 se seleccionan para medir el efecto antiproliferativo sobre dosis cada vez mayores de IFNs, de 50 unidades/ml a 5,000 unidades/ml. En general, la inhibición de

crecimiento luego del agregado de IFN beta es mucho mayor que el efecto observado luego del agregado de IFN alfa o IFN gamma: inhibición del 40 al 80% para el IFN beta contra 6 a 10% y 6 a 20% para IFN gamma e IFN alfa, respectivamente. Este fenómeno ocurre independientemente de la dosis de IFN utilizada. Puede notarse que el agregado de IFN beta en dosis de 500 unidades/ml ofrece prácticamente la máxima respuesta antiproliferativa.

Los efectos diferenciales observados entre los dos IFNs podrían ser la consecuencia de una diferencia en el mecanismo de activación de los genes inducidos por los IFNs e involucrados en su efecto antiproliferativo, tales como los genes que codifican para la 2'5'oligo(A)-sintetasa o IRF-1 (Factor Regulador del Interferón 1).

Ejemplo 2

Acción Antiproliferativa del IFN Beta sobre el Crecimiento de los Tumores de Ewing. Estudio in vivo en Ratones Desnudos.

A. Inyección de Células Neoplásicas

Se generaron tumores sólidos por inyección subcutánea de 20×10^6 células EW-7 (línea celular derivada de un tumor de omóplato) del tumor primario antes de quimioterapia (EW exón 7/Fli exón 6) en ratones desnudos de seis semanas de edad.

Transcurridos diez días, se constituyeron dos grupos de cinco ratones cada uno, un grupo control de ratones y un grupo de ratones que recibió IFN beta (REBIF®).

Las inyecciones se aplicaron en el tumor con 5×10^5 unidades de IFN por ratón, tres veces por semana. Se continuó el tratamiento durante un período de cinco semanas durante el cual se determinaron los volúmenes de tumor cada tres días.

Los volúmenes relativos de tumor (VRT) demuestran un crecimiento tumoral más lento luego de la inyección con IFN beta. La Figura 3 construida con los datos del promedio de los VRT, muestra una disminución muy pronunciada de las tasas de crecimiento del *turnover* luego de la inyección con IFN beta.

Estos resultados de los tumores establecidos en la fase de crecimiento experimental permiten la confirmación de los resultados obtenidos *in vitro* con las líneas celulares.

B. *Implante del Tumor Sólido*

Se efectuó un segundo experimento *in vivo* en ratones desnudos de ocho semanas de edad. Se transplantó a un ratón desnudo una muestra de tumor de 5 mm de diámetro extraída de un tumor sólido desarrollado en un ratón desnudo luego de inyecciones de 20×10^6 células EW7, conservadas por transferencia *in vivo*.

Tres días después del transplante, se constituyeron dos grupos formados por 12 ratones cada uno, un grupo control que recibió inyecciones de solución tamponada de fosfato (PBS) y un grupo que recibió inyecciones de IFN beta. Se inyectaron 1×10^6 unidades de IFN beta en el sitio del tumor siguiendo un esquema de aplicación de cinco días a la semana (de lunes a viernes) durante 1 mes.

Las curvas de crecimiento tumoral se determinaron luego de medir los diámetros de los tumores injertados en cada ratón dos veces por semana. *Ver Fig. 4.*

La Figura 4 muestra las curvas obtenidas a partir del VRT promedio para cada grupo de doce ratones. Se observó una progresión casi lineal del desarrollo del tumor en los ratones control, mientras que la proliferación tumoral fue prácticamente nula en los injertos que recibieron IFN beta. Este resultado fue confirmado por cálculo de la mediana para cada grupo. *Ver Fig. 5.*

Es destacable observar que transcurrido un mes de la interrupción de la administración de inyecciones de IFN, 40% de los ratones que habían recibido IFN beta no desarrollaron tumores.

Ejemplo 3

Efecto del IFN- sobre la Expresión de IRF-1 en Líneas Celulares Derivadas del Sarcoma de Ewing.

Para investigar la expresión del gen IRF-1 y su regulación por el IFN beta, los autores de la invención comprobaron la expresión del gen IRF-1 por transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los ARNs totales

extraídos a las 3, 6 y 18 horas posteriores al tratamiento con IFN beta demostraron que el ARNm específico de IRF-1 fue inducido por el IFN beta. En las células EW-7, el IFN beta indujo la expresión del gen IRF-1 en forma dependiente de tiempo por hasta seis horas de estimulación. Sin embargo, luego de la estimulación por IFN beta, el ARNm de IRF-1 fue aún detectable a las 18 horas. Se obtuvieron resultados para las otras tres líneas celulares ES, pero con diferentes niveles de inducción del gen IRF-1.

Ejemplo 4

Relación entre la Expresión de IRF-1 y la Apoptosis Inducida por IFN Beta en Líneas Celulares del Sarcoma de Ewing.

Los autores de la invención estaban particularmente interesados en determinar si la estimulación de estas líneas celulares ES por el IFN beta provocaban la apoptosis, y la posible relación entre la apoptosis y la expresión del gen IRF-1. A este fin, se evaluó la fragmentación nuclear por tinción de Hoechst, y se cuantificó por conteo del número de células apoptóticas en las poblaciones totales de células no tratadas o células tratadas con IFN beta durante 48 o 72 horas. *Ver Fig. 6.* Las células EW-7 y COH exhibieron un aumento dependiente del tiempo en las células apoptóticas luego del tratamiento con IFN beta, mientras que las células EW-1 y ORS no sufrieron de apoptosis significativa durante ninguno de los períodos del tratamiento con IFN beta. Las diferencias en la sensibilidad de las cuatro líneas celulares ES a la apoptosis dependiente de IFN beta, y la correlación entre los niveles de proteínas p21^{WAF-1/Cip-1} y Bcl-2 se analizaron por pruebas de inmunoblot luego del tratamiento con IFN beta. La *downregulation* de la proteína total celular Bcl-2 se correlacionaba con la *upregulation* de p21^{WAF-1/Cip-1} y la expresión de IRF en células EW-7 y COH, mientras que no se observaron cambios en la expresión de la proteína Bcl-2 en las células EW-1 u ORS. La proteína p21^{WAF-1/Cip-1} no fue detectable en células EW-1 u ORS, independientemente de que fueran tratadas con IFNs o no.

Dado que se ha demostrado que la inducción de apoptosis por parte de las citoquinas involucra la expresión de genes de caspasa, los autores de la invención exploraron el posible aumento de la activación de la expresión del gen de caspasa en líneas celulares de ES por parte del IFN beta. A tal fin, se efectuaron ensayos de

protección de RNase para la familia caspasa usando el kit hApol (Pharmigen), luego de la estimulación de células de ES con IFN beta durante 18 horas. La expresión del ARNm de caspasa-7 aumentó significativamente en las células EW-7 estimuladas con IFN beta y en menor medida el nivel de ARNm de la caspasa-3 y -8; los niveles de ARNm de caspasas-1, -6 y -9 permanecieron inalterados. Se observaron resultados similares en células COH. En células EW-1 y ORS, los niveles de ARNm de caspasas permanecieron inalterados.

En vista de los resultados del ensayo de protección de RNasa, los autores investigaron la posibilidad de que el IFN beta activara la proteólisis que lleva a la formación de subunidades de caspasa activa. La caspasa-1 proteolizada de 20 kDa se reveló inicialmente con sondas de anticuerpos contra la forma activa de caspasa-1. Luego de separar los puntos (*blots*), se detectaron las formas de 35 kDa y 18kDa de caspasa-7 que son anticuerpos de ratón purificados de Pharmingen (Becton Dickinson). El análisis por inmunoblot con anticuerpos contra caspasa-7 reveló que el IFN beta no sólo aumentó la cantidad de proteína procaspasa-7, sino que también generó la subunidad proteolizada activa de 18 kDa. *Ver Fig. 7.* Estos procesos fueron sólo observados en las células tumorales EW-7 y COH que tienen p53 de tipo normal. También se observó un aumento en la subunidad de 20 kDa de caspasa-1 en células EW-7 y COH luego del tratamiento con IFN alfa o IFN beta, aunque no fue detectable en células EW-1 u ORS. *Ver Fig. 7.* Tanto el aumento en la expresión del gen en la caspasa-7 y el corte de pro-caspasa-7 detectado luego del tratamiento con IFN beta sugieren el IFN beta gatilla la muerte celular por una *upregulation* selectiva de la caspasa-7 en células tumorales del sarcoma de Ewing.

Ejemplo 5

Expresión Ectópica de IRF-1

Para demostrar el papel que desempeña el IRF-1 en la apoptosis en las células del sarcoma de Ewing, los autores de la invención intentaron generar células que expresaran IRF-1. Debido a los fuertes efectos citotóxicos de IRF-1 endógeno es difícil obtener líneas de células de ES que expresen IRF-1 en forma constitutiva. Por lo tanto, se utilizó una forma inducible de IRF-1 para determinar si la inducción de IRF-1 activaba la muerte de las células de tumor de Ewing, que son normalmente

resistentes a la muerte celular mediada por el IFN beta. En consecuencia, se usó un sistema inducible por tetraciclina usando el activador de la tTA reversa (tTA_r) que permite la expresión inducible por doxyciclina (Dox) de IRF-1. Ver Nguyen *et al.*, *Oncogene*, 15: 1425-1435 (1997). Los clones de células de tTA_r-IRF-1 de las cuatro líneas celulares de SE fueron expandidos en forma individual y relevados para detectar la expresión de IRF-1 por análisis Western blot, luego de 48 horas de crecimiento en medio con o sin Dox. La estimulación de Dox llevó a la inducción de la proteína IRF-1 en las cuatro líneas celulares SE-TA/IRF-1 pero no en las líneas celulares de tTA_r control. Para determinar si la inducción de IRF-1 estaba asociada con la fragmentación nuclear, se tiñeron las células con tinción fluorescente de Hoechst luego del tratamiento con Dox de las células transfectadas durante 24 o 48 horas. La totalidad de las líneas celulares SE-TA/IRF-1, independientemente de su tipo de p53, sufrieron de apoptosis dependiente del tiempo luego de la estimulación con Dox. A las 48 horas de la estimulación con Dox se detectaron de 40 a 50% de células apoptóticas. A las 96 horas de la estimulación todas las células habían sufrido apoptosis. El análisis Western blot de los extractos totales de células SE-TA/IRF-1 mostraron una correlación entre la inducción de IRF-1 por Dox y la *upregulation* de p21^{WAF-1/Cip-1} con la *downregulation* concomitante de la proteína Bcl 2. También se observó una cantidad cada vez mayor de la subunidad activa proteolizada de caspasa-7 en las cuatro líneas celulares SE-TA/IRF-1 tratadas con Dox durante 48 horas, pero no en las líneas celulares tTA_r control. Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la caspasa-7 está involucrada en la apoptosis mediada por IRF-1 en las células de sarcoma del Ewing.

Ejemplo 6

Actividad Antitumoral del IFN- sobre el Tumor de Ewing.

Estudio en Ratones Desnudos.

El propósito de este experimento fue estudiar el efecto del IFN beta sobre el desarrollo y crecimiento de un tumor de Ewing.

Se injertaron a ratones desnudos de ocho semanas de edad una muestra de tumor de 5 mm de diámetro obtenidos de tumores sólidos desarrollados en ratones desnudos mediante la inyección de 20×10^6 células EW-7. Las células EW-7 fueron

preservadas por transferencia *in vivo*. Luego de tres semanas, los ratones que habían desarrollado un tumor de aproximadamente 100-200 mm³ fueron divididos al azar en dos grupos de 12 ratones; el primer grupo recibió PBS como control y el segundo, IFN beta (REBIF®).

Se inyectó una dosis de 8×10^5 unidades IFN beta en la masa tumoral por ratón cinco veces a la semana (Lunes a Viernes). La administración continuó durante 5 semanas durante las cuales los tumores se midieron cada tres días.

Los volúmenes relativos (VRT) y la mediana de los diámetros de los tumores que se definieron en consecuencia revelaron una marcada disminución de la velocidad de desarrollo del tumor. *Ver Figs.8 y 9.*

Este experimento sobre tumores existentes en su fase de crecimiento exponencial demostró claramente que el IFN beta posee un efecto antitumoral sobre tumores de Ewing.

Ejemplo 7

Efecto de la Asociación Quimioterapia/IFN- sobre el Crecimiento de los Tumores de Ewing en Ratones Desnudos.

Se investigó el efecto de un tratamiento quimioterapéutico con Ifosfamida, asociado con el tratamiento con IFN beta. Se administró a ratones desnudos con tumor de Ewing Ifosfamida a razón de 60 mg/kg de peso corporal de durante tres días conjuntamente con una administración intratumoral de 100.000 U/día de IFN beta. Este tratamiento fue seguido por la administración de IFN beta solamente 5 veces por semana.

El crecimiento del tumor de Ewing fue inhibido con estos tratamientos asociados, mientras que el tamaño del tumor permaneció estable. Los tratamientos asociados tienen un efecto sinérgico dado que dicha acción es más efectiva que la resultante de la administración en forma independiente de IFN beta e Ifosfamida.

* * * * *

La presente invención ha sido descrita en detalle y ejemplificada para facilitar su comprensión y reproducción. Ciertos cambios en la manera de llevar a cabo la

misma pueden ser realizados por una persona normalmente versada en la materia técnica relacionada sin exceder el objeto y alcance de las reivindicaciones de la presente invención. Todas las publicaciones citadas se incorporan como referencias en su totalidad a la descripción de la invención.

Reivindicaciones

Se Reivindica:

1. *bf* Un método para el tratamiento de la familia de tumores de Ewing caracterizado por que comprende tratar células tumorales de tumores de Ewing con interferón beta.
2. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que el tumor de Ewing es un sarcoma.
3. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que el interferón beta es 1a.
4. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que el interferón beta es recombinante.
5. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que el interferón beta utilizado es glicosilado.
6. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende administrar el interferón beta en forma oral o parenteral.
7. *bf* Un método, según la reivindicación 6, caracterizado por que la forma parenteral de administración es intramuscular, endovenosa, subcutánea o percutánea.
8. *bf* Un método, según la reivindicación 6, caracterizado por que el interferón beta se administra en forma sistémico.
9. *bf* Un método, según la reivindicación 6, caracterizado por que el interferón beta se administra por inyección directa al tumor de Ewing.
10. *bf* Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende administrar el interferón beta en cantidades eficaces.
11. *bf* Un método, según la reivindicación 10, caracterizado por que la cantidad eficaz de administración comprende entre 1 y 90 millones de unidades internacionales de interferón beta.
12. *bf* Un método, según la reivindicación 11, caracterizado por que la cantidad eficaz de administración comprende entre 1 y 45 millones de unidades internacionales de interferón beta.

13. ^{6f} Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende utilizar uno o más agentes inhibidores de la familia de tumores de Ewing conjuntamente con el interferón beta.
14. ^{6f} Un método, según la reivindicación 13, caracterizado por que el agente inhibidor comprende doxorubicina, actinomicina, ciclofosfamida, etoposide, ifosfamida y vincristina.
15. ^{6f} Un método, según la reivindicación 14, caracterizado por que el agente inhibidor es ifosfamida.
16. ^{6f} Un método, según la reivindicación 13, caracterizado por que el agente inhibidor se administra simultáneamente con el interferón beta.
17. ^{6f} Un método, según la reivindicación 13, caracterizado por que el agente inhibidor se administra secuencialmente con el interferón beta.
18. ^{6f} Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que las células tumorales son células de mamífero.
19. ^{6f} Un método, según la reivindicación 18, caracterizado por que las células tumorales son de origen humano.
20. ^{6f} Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que las células tumorales se tratan in vitro.
21. ^{6f} Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que las células tumorales se tratan in vivo.
22. ^{6f} Un método, según la reivindicación 2, caracterizado por que la sensibilidad de las células del sarcoma de Ewing a la apoptosis mediada por interferón beta se determina mediante la expresión del gen de caspasa-7.
23. ^{6f} Un método, según la reivindicación 22, caracterizado por que la expresión del gen de caspasa-7 se determina por la técnica de inmunoensayo.
24. ^{6f} Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por que las células tumorales son derivadas de una muestra quirúrgica de tumores de Ewing.
25. ^{6f} El interferón beta caracterizado según la reivindicación 1.

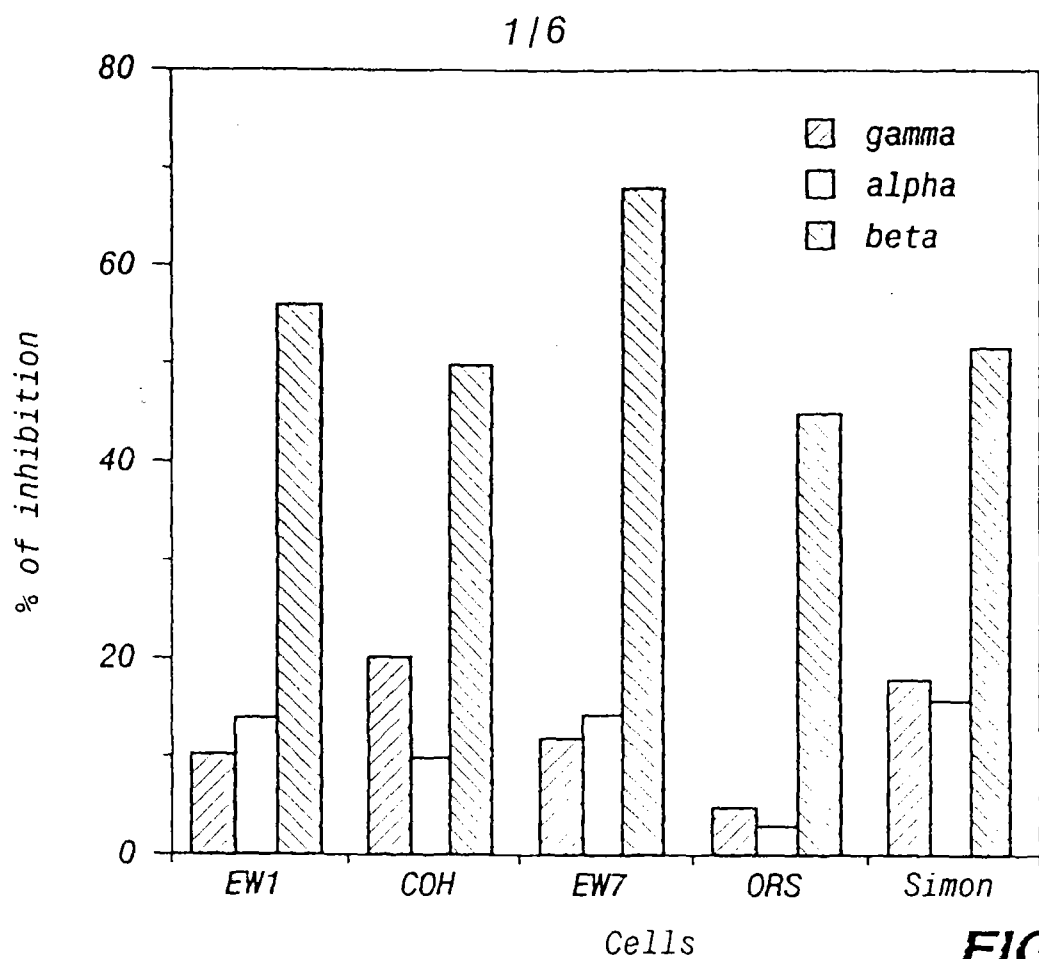


FIG.1

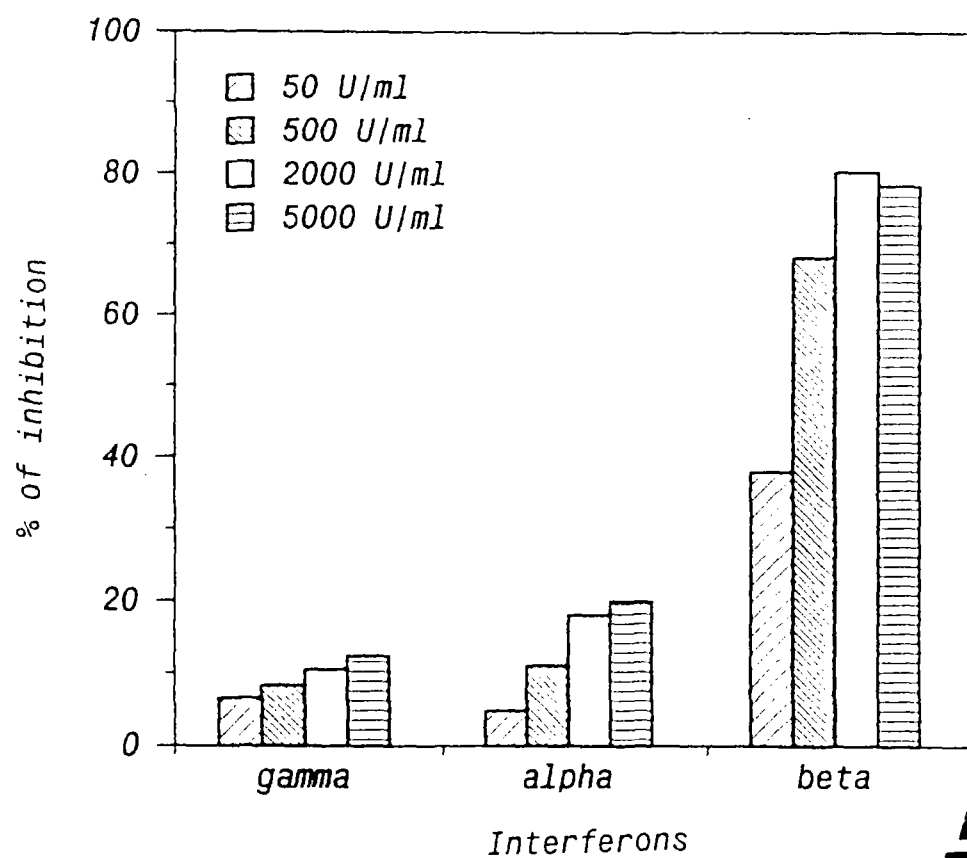


FIG.2

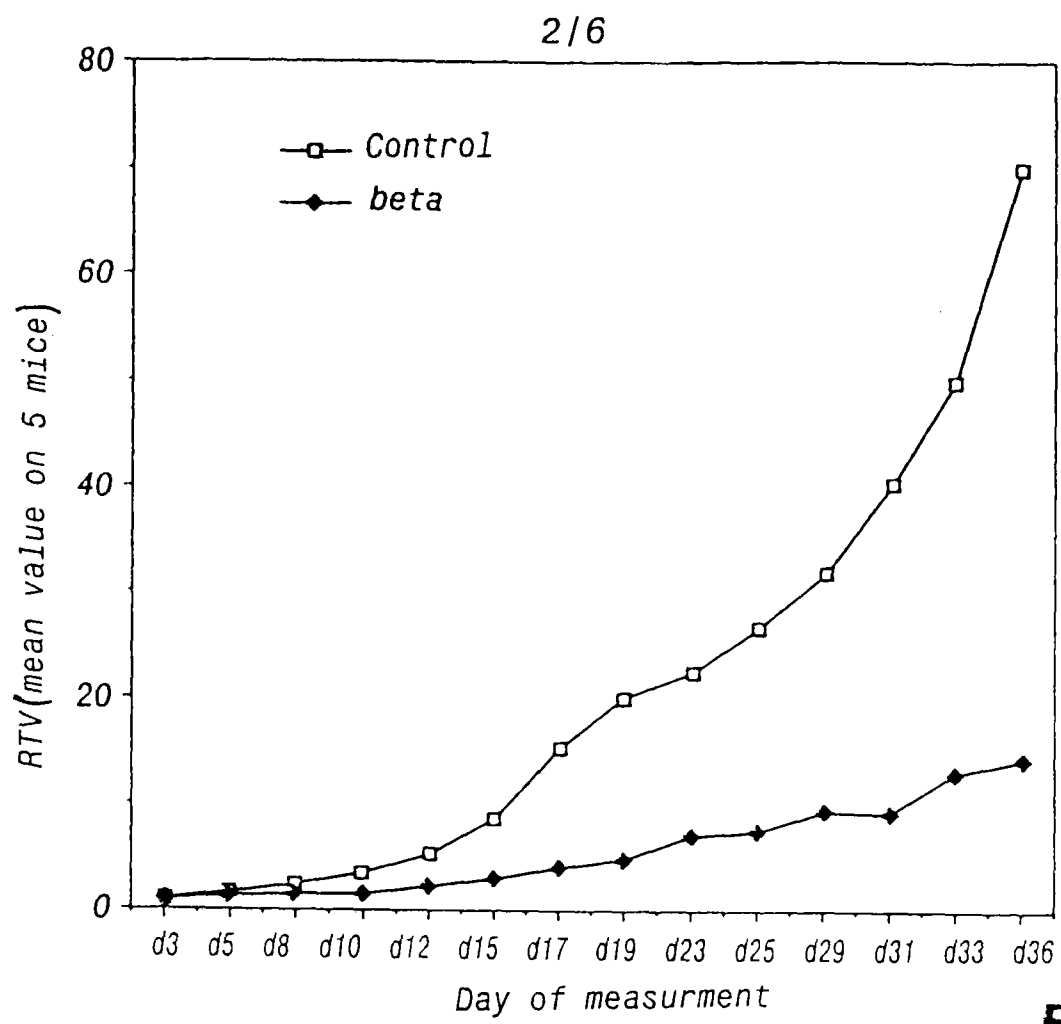


FIG.3

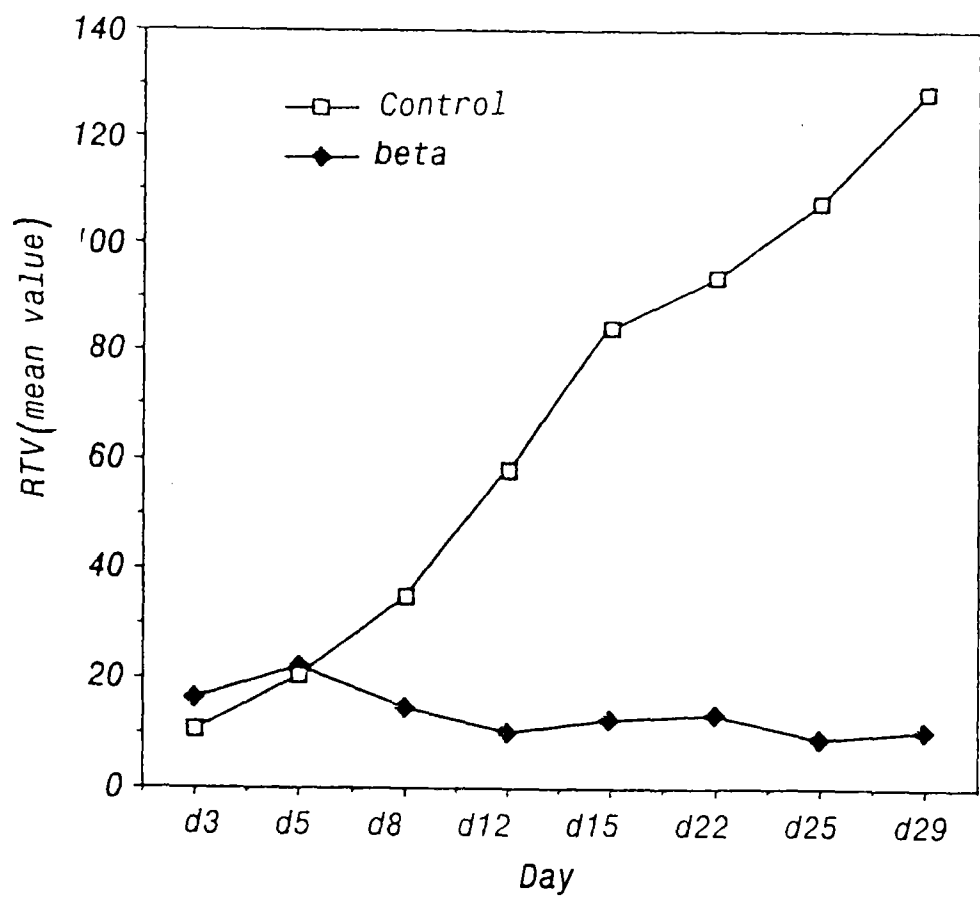


FIG.4

3/6

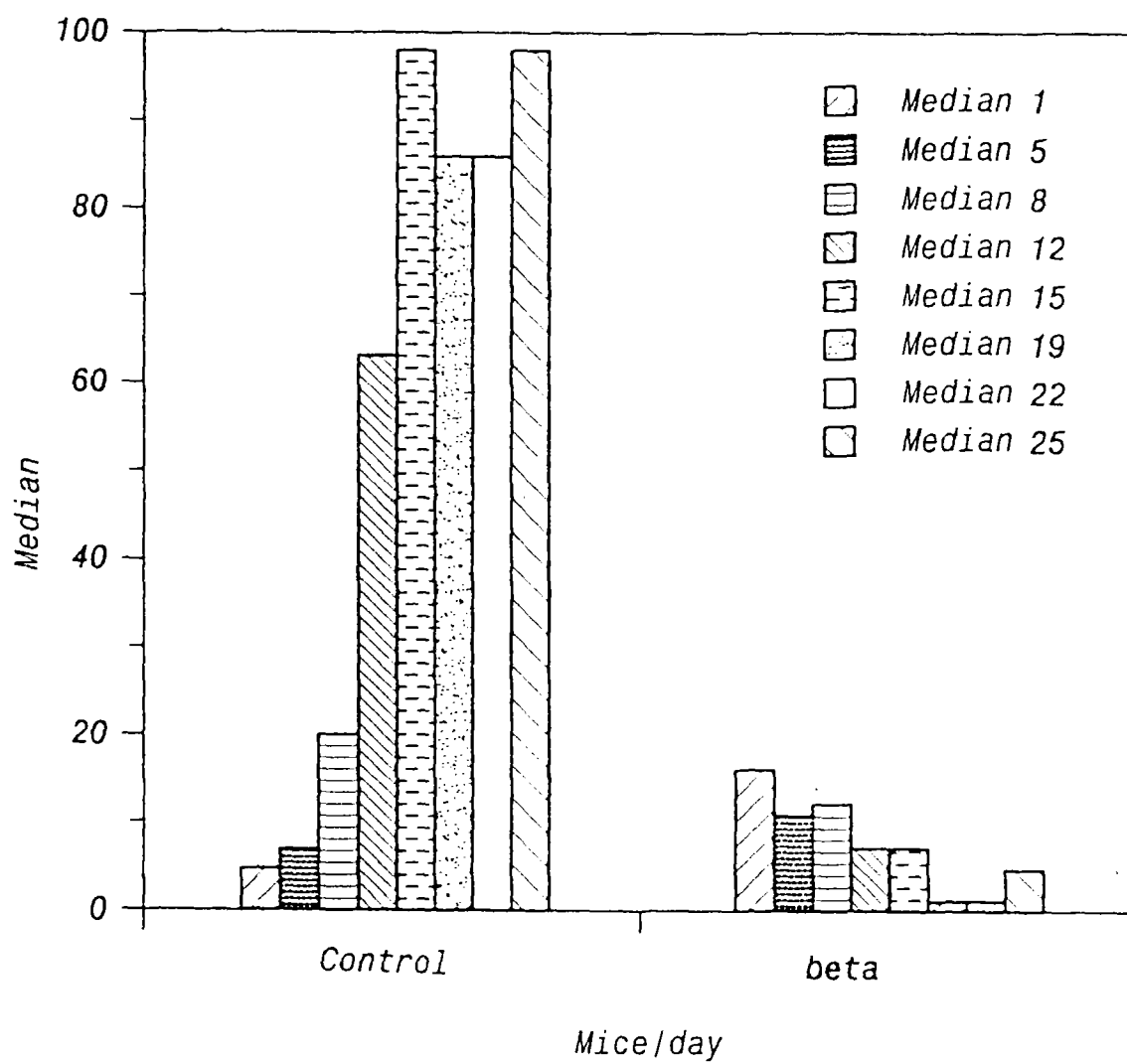


FIG.5

4/6

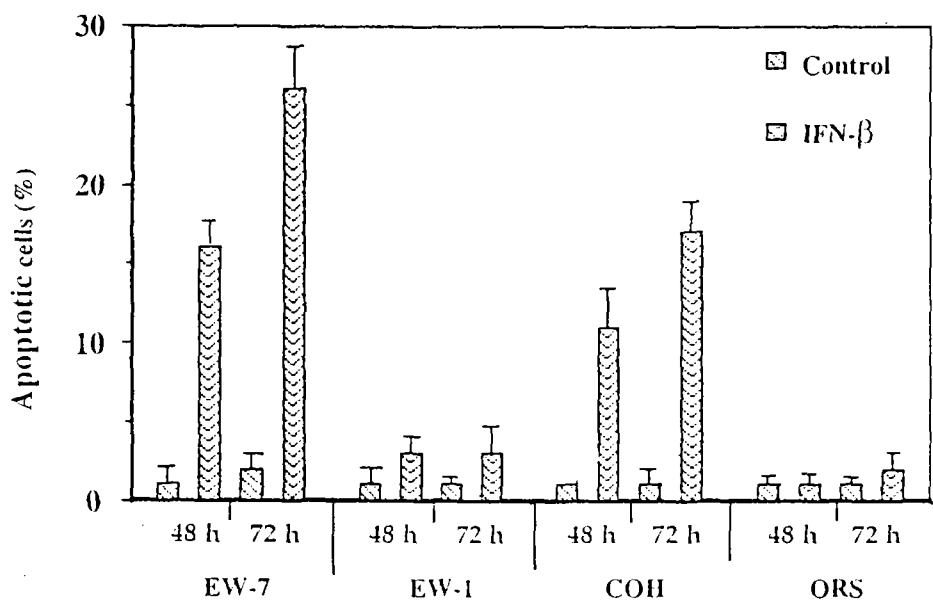


FIG.6

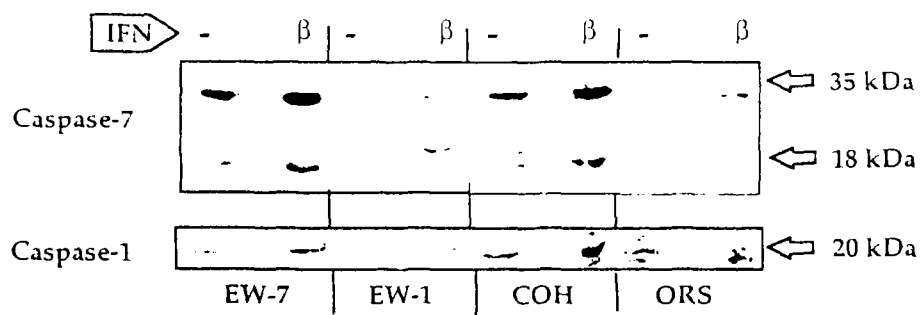
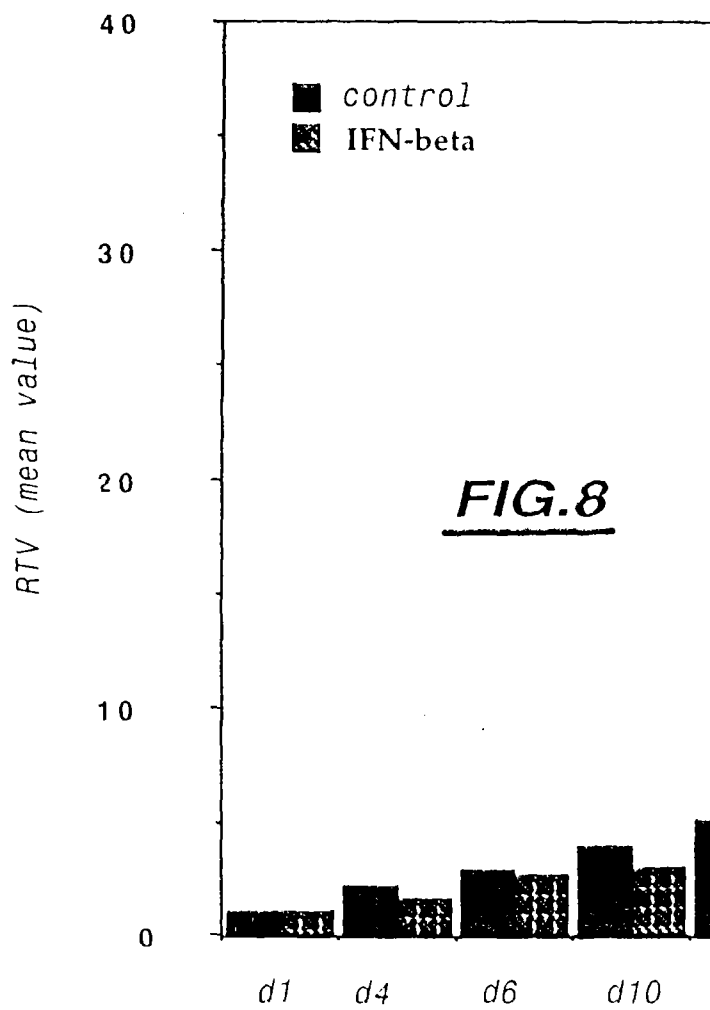
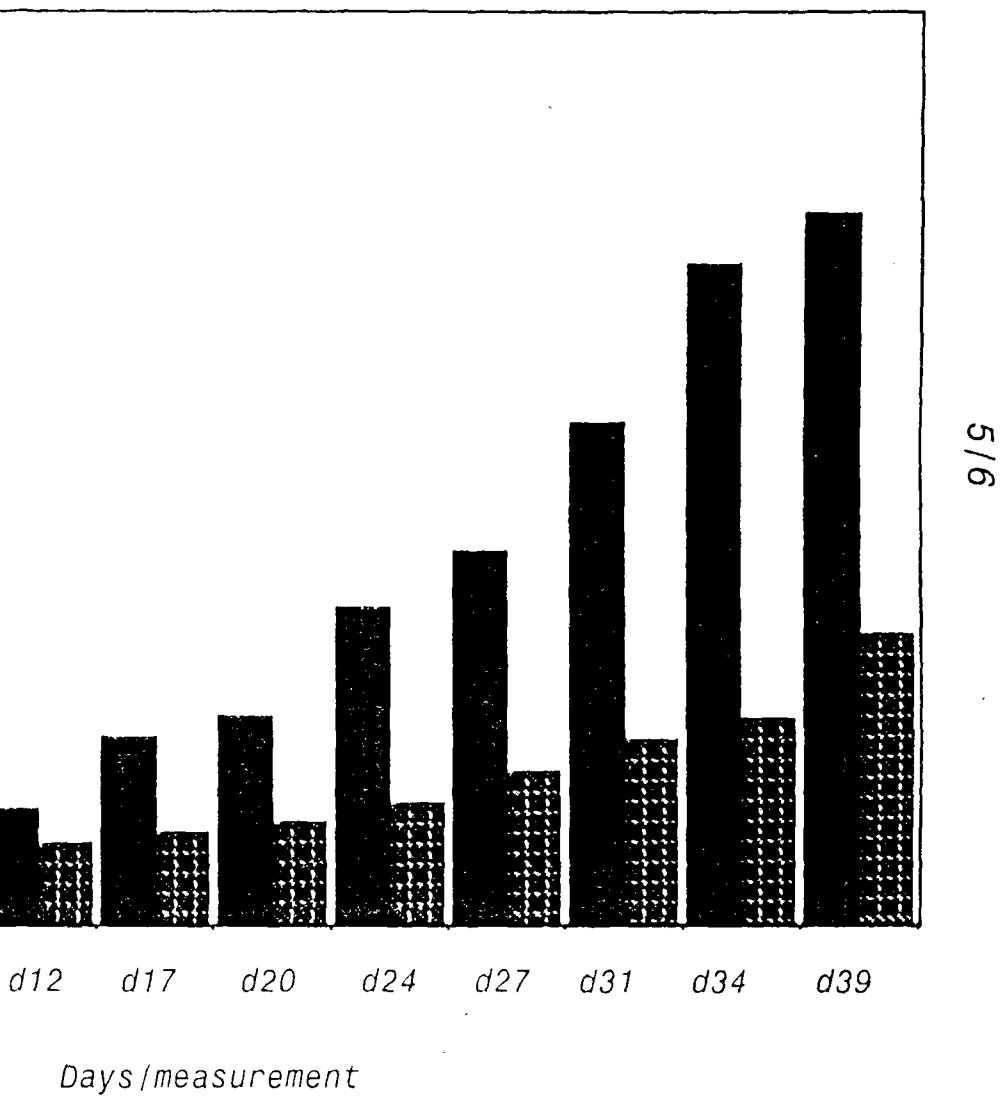
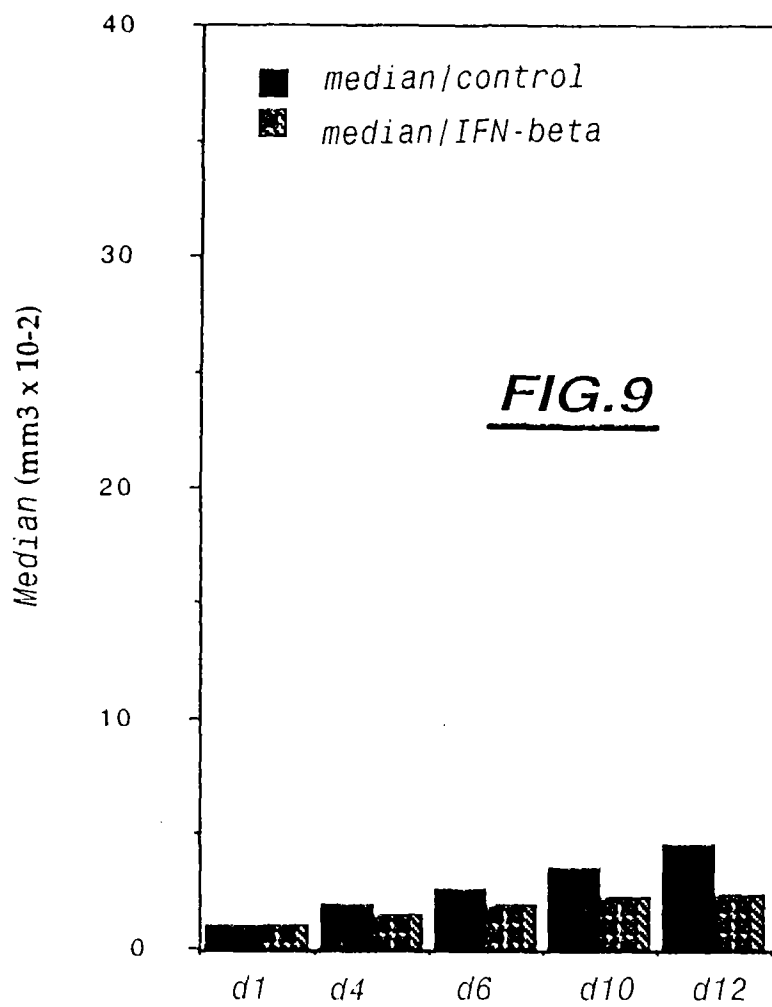
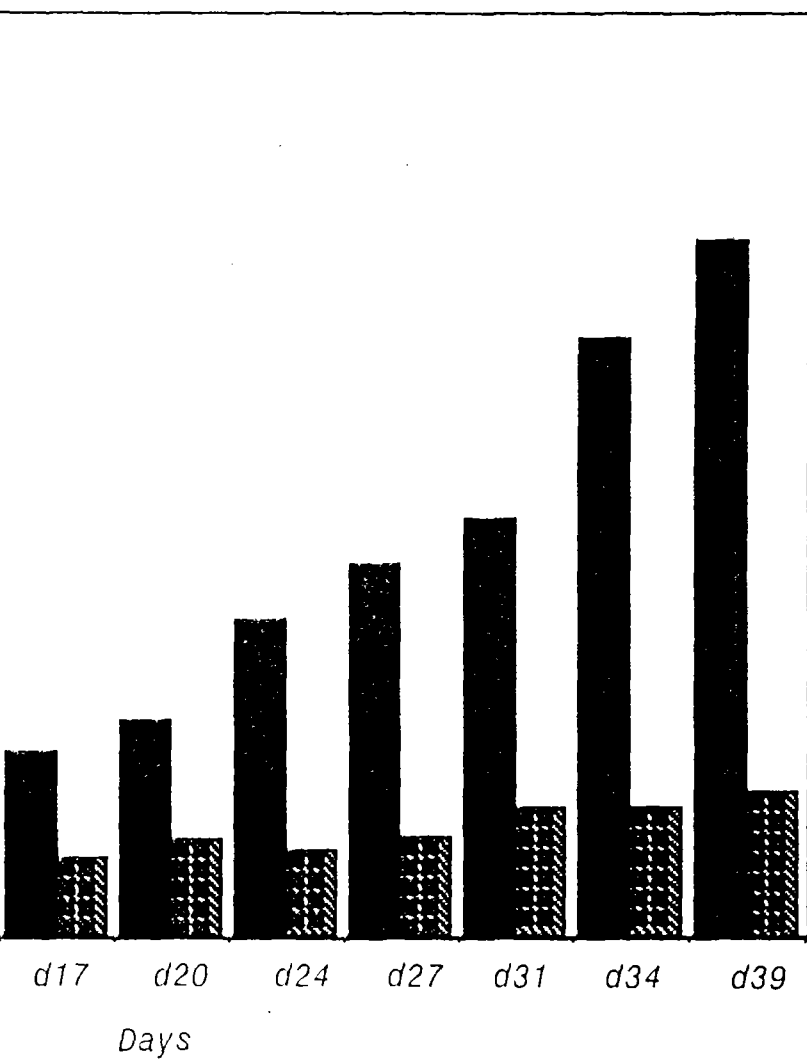


FIG.7









9/9

Método para el Tratamiento de la Familia de Tumores de Ewing

Resumen

La invención se refiere un método para el tratamiento de los tumores de la familia Ewing mediante el uso de interferón beta. Se describe un método para la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de interferón beta a un mamífero afectado de un tumor de la familia de Ewing. La presente invención además se refiere a los compuestos farmacéuticos adecuados para la administración a mamíferos para el tratamiento de los tumores de la familia de Ewing que comprende interferón-beta en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con un transporte aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

↳ Los folios 33 a 35 son tarjetas y extracto *202012*

* junio 20/2000 *

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Nombre e identificación del Solicitante |
- Nombre e identificación del Inventor |
- Título o nombre de la Invención |
- Descripción
- Reivindicaciones
- Resumen
- Comprobante de Pago 3

☒
☒
☒
☒
☒
☒
☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

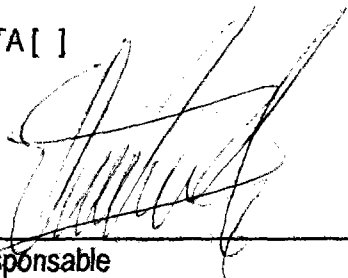
DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- Nombre e identificación del peticionario
- Nombre e identificación del inventor o diseñador
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- Representación gráfica
- Comprobante de pago

☐
☐
☐
☐
☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00034695 00000000 Folios: 35
Fecha Fecha (AMD): 2000-05-15 10:53:21
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

38
34

**EXTRACTO PARA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

- | | |
|--|--|
| (21) ^{nº Radicación} No.SOLICITUD: 00-34695 | (51) INT.CL: A61K 38/19 ⁶ |
| (22) FECHA DE PRESENTACIÓN: 2000-05-15 | (71) SOLICITANTE: 1.- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
2.- Institut Curie
3.- BIO SIDUS S.A. |
| (30) PRIORIDAD: _____ | |
| (31) No.DE SOLICITUD: _____ | (72) INVENTOR(ES): Jeanne WITZERBIN
Josiane SANCEAU |
| (32) FECHA DE PRESENTACIÓN: _____ | |
| (33) PAÍS: _____ | (74) APODERADO: Humberto RUBIO CAMACHO |

(54) TÍTULO: "METODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FAMILIA DE TUMORES DE EWING"

(57) RESUMEN:

Un método para el tratamiento de la familia de tumores de Ewing caracterizado porque comprende tratar células tumorales de tumores de Ewing con interferón beta.

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-34695.

Fecha: 18 de Mayo del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 2 de Febrero del 2000,
del folio 111947 al folio 111951 del
libro de Protocolo N° 410, obra el poder
N° 20017 conferido por BIO SIDUS
S.A.

domiciliado(a) en Buenos Aires, Argentina

al doctor HUMBERTO RUBIO CAMACHO Y/O GABRIEL REINA
ROMERO Y/O TINEKE STOL

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos

Facultad para desistir SI.

Revisado _____.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430

2000-05-18

EXPEDIENTE 2000-34695

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).
- SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).
- SI ☒ NO ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 002 del 4 de Enero del 2000).
- SI ☐ NO ☐ **EXTEMPORANEAMENTE** ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.
- SI ☐ NO ☐ **NO APLICABLE** ☒ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.
- SI ☐ NO ☐ **NO APLICABLE** ☒ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES: * El interesado debe allegar los documentos que acrediten la existencia y representación legal de los solicitantes INSERM e Institut Curie, junto con los poderes respectivos.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 18 de Mayo del 2000

EXAMINADOR JURIDICO
202022

1º EXAMEN DE FORMA

Radicación nº 00-34695

430

2000-06-20

CONCEPTO TÉCNICO Nº 949

IPC: A61K 38/19

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c). |
| SI ☐ NO ☐ | Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94. |
| SI ☐ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☒ NO ☐ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 20 de junio de 2000

202012

40 30
430
2000-08-31

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-34695

AUTO 1631

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor HUMBERTO RUBIO CAMACHO como apoderado de la Sociedad BIO SIDUS S.A., en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 29 AGO. 2000

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C. 31 AGO 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA