

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de F
División de Nu

80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-136147-00000-0000
Fecha: 2010-11-03 13:25:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-136147

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA
CANCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE
CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGENESIS
Y METASTASIS"

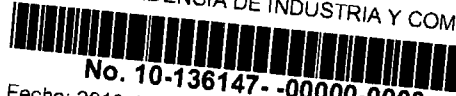
51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE The Regents of The University
of California

DOMICILIO Oakland, California, EE.UU.

74. APODERADO Humberto Rubio Camacho

22. BOGOTÁ, D.C., 3 de Noviembre/2010



No. 10-136147-00000-0000

Fecha: 2010-11-03 13:25:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I Capítulo II

SOLICITANTE Nombre y **The Regents of the University of California**
(71) Dirección: **1111 Franklin Street, 12th Floor,**
Oakland, California 94607-5200, Estados Unidos de America
Lugar de constitución: **Oakland, California, Estados Unidos de America**

REPRESENTANTE Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. No. **17192.062**
(74) Teléfono: **3132408 Fax: 3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES): Nombre y **1- Robert E. REITER**
(72) Dirección: **10511 Kinnard Avenue,**
Los Angeles, California 90024-6017, Estados Unidos de America
2- Zev WAINBERG
1917 Hillsboro Avenue,
Los Angeles, California 90035, Estados Unidos de America

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2009/039526** Fecha **3 DE ABRIL DE 2009**
Publicación Internacional No. **WO 2009/124281** Fecha **8 DE OCTUBRE DE 2009**

TITULO (54) **"NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA CÁNCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS"**

Clasificación Internacional (51) **C07K 16/00 C12N 5/00**

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	4 DE ABRIL DE 2008	61/042,604
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	10 DE NOVIEMBRE DE 2008	61/113,054

Comprobante de pago No. **10-93,250** Fecha: **3 DE NOVIEMBRE DE 2010**
10-93,251 **3 DE NOVIEMBRE DE 2010**

BAP

Nuevo Título → Composiciones y métodos que proporcionan una línea celular de Hibridoma Depositada como No. de acceso a ATCC PTA-9387 y un Anticuerpo producido por esta línea celular de Hibridoma

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE

(71) SOLICITANTE: **The Regents of The University of California**

PRESENTACIÓN:

(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**

(31) No. DE SOLICITUD: **61/042,604** (72) INVENTORES: **Robert E. REITER**
61/113,054 **Zev WAINBERG**

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: **4 DE ABRIL DE 2008**
10 DE NOVIEMBRE DE 2008

(33) PAÍS: **ESTADOS** (74)APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO**
UNIDOS DE AMERICA

Solicitud Internacional No. **PCT/US2009/039526** Fecha **3 DE ABRIL DE 2009**

Publicación Internacional No. **WO 2009/124281** Fecha **8 DE OCTUBRE DE 2009**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA CÁNCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS"

RESUMEN:

Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9387.
Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de la reivindicación 1.
Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9388.
Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 4.
Un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar a dominios 1-3 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, in vivo o in vitro, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9387.

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones
- Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- Poderes, si fuere el caso.
- Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- Declaraciones
- ☒ Copia de la publicación PCT
- ☒ Copia informe búsqueda internacional.
- Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 36.2.b PCT en Fase Nacional.
- De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros - Opinión escrita de la autoridad encargada de búsqueda Int.
- Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad GpI (RT/15/370)

(11) Figura característica:

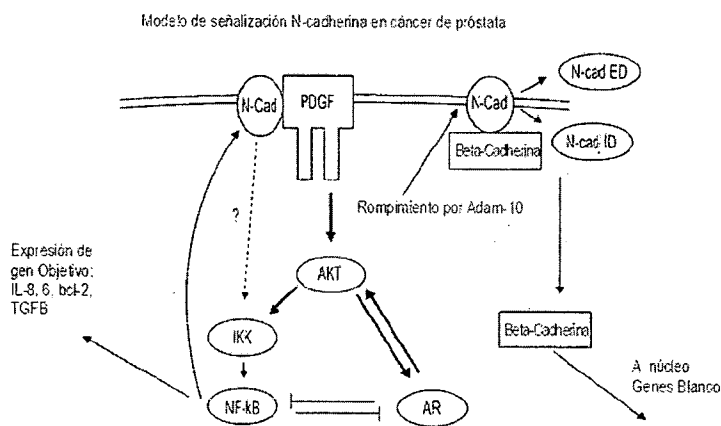


FIG. 1

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

**SOLICITUD PATENTE FASE NACIONAL
PCT/US2009/039526**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-136147- -00000-0000

Fecha: 2010-11-03 13:25:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 93,250
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80951304	03/11/2010	2,362,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

EXCEDENTE REIVINDICACIONES
PCT/US2009/039526

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-136147- -00000-0000

Fecha: 2010-11-03 13:25:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 93,251
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80851304	03/11/2010	2,362,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	598,000.00
		TOTAL :	\$ 599,000.00

SON: QUINIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

5



(43) International Publication Date
8 October 2009 (08.10.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/124281 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2009/039526

(22) International Filing Date:

3 April 2009 (03.04.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/042,604 4 April 2008 (04.04.2008) US

61/113,054 10 November 2008 (10.11.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA** [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607-5200 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **REITER, Robert, E.** [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, CA 90024-6017 (US). **WAINBERG, Zev** [US/US]; 1917 Hillsboro Avenue, Los Angeles, CA 90035 (US).

(74) Agents: **GAO, Chuan et al.; Townsend And Townsend and Crew LLP**, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111 (US)

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

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

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTIBODIES AGAINST CANCER TARGET BLOCK TUMOR GROWTH, ANGIOGENESIS AND METASTASIS

Model of N-cadherin signaling in prostate cancer

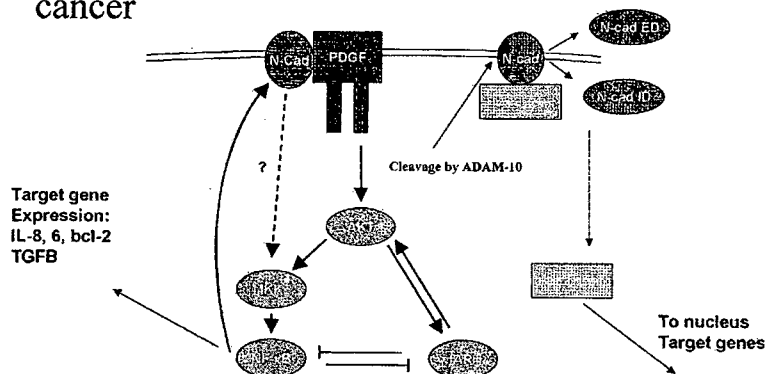


FIGURE 1

(57) Abstract: The present invention provides antibodies that target the first-third domains of N-cadherin and the fourth domain of N-cadherin, for diagnosis and therapy of cancers related to N-cadherin. Methods of diagnosis and treatment utilizing these antibodies are also described.



(43) International Publication Date
8 October 2009 (08.10.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/124281 A3

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/039526
- (22) International Filing Date:
3 April 2009 (03.04.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/042,604 4 April 2008 (04.04.2008) US
61/113,054 10 November 2008 (10.11.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA** [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607-5200 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **REITER, Robert, E.** [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, CA 90024-6017 (US). **WAINBERG, Zev** [US/US]; 1917 Hillsboro Avenue, Los Angeles, CA 90035 (US).
- (74) Agents: **GAO, Chuan et al.**; Townsend And Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTIBODIES AGAINST CANCER TARGET BLOCK TUMOR GROWTH, ANGIOGENESIS AND METASTASIS

Model of N-cadherin signaling in prostate cancer

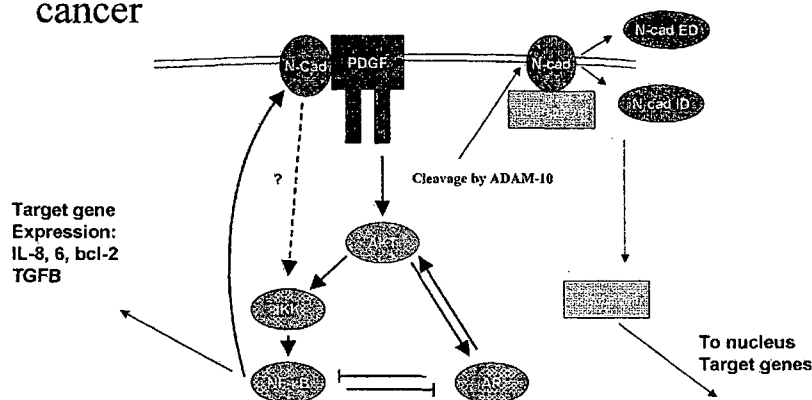


FIGURE 1

(57) Abstract: The present invention provides antibodies that target the first-third domains of N-cadherin and the fourth domain of N-cadherin, for diagnosis and therapy of cancers related to N-cadherin. Methods of diagnosis and treatment utilizing these antibodies are also described.



(88) Date of publication of the international search report:
30 December 2009

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 October 2009 (08.10.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/124281 A9

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/039526

(22) International Filing Date:
3 April 2009 (03.04.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/042,604 4 April 2008 (04.04.2008) US
61/113,054 10 November 2008 (10.11.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFOR-
NIA [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland,
CA 94607-5200 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): REITER, Robert,
E. [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, CA
90024-6017 (US). WAINBERG, Zev [US/US]; 1917
Hillsboro Avenue, Los Angeles, CA 90035 (US).

(74) Agents: GAO, Chuan et al.; Townsend And Townsend
and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San
Francisco, CA 94111 (US).

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

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

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(88) Date of publication of the international search report:
30 December 2009

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTIBODIES AGAINST CANCER TARGET BLOCK TUMOR GROWTH, ANGIOGENESIS AND
METASTASIS

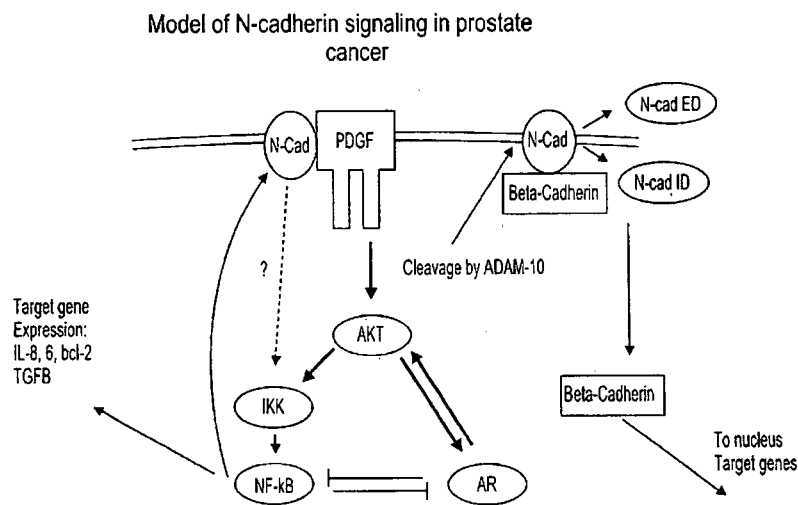


FIG. 1

(57) Abstract: The present invention provides antibodies that target the first-third domains of N-cadherein and the fourth domain of N-cadherin, for diagnosis and therapy of cancers related to N-cadherein. Methods of diagnosis and treatment utilizing these antibodies are also described.



(48) Date of publication of this corrected version:

18 February 2010

(15) Information about Correction:

see Notice of 18 February 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/39526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 5/00; C07K 16/00 (2009.01)

USPC - 435/326, 346; 530/387.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): C12N 5/00; C07K 16/00 (2009.01)

USPC: 435/326, 346; 530/387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
J of Cell Biology, Vol 151, No 6

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): cadherin, hybridoma, antibody, domain, cancer, third domain, PTA-9387

esp@cenet: hybridoma, california, cadherin, cancer; Google Scholar: cadherin hybridoma antibody cancer domain ATCC PTA-9387

ATCC: PTA-9387; Dialog Pro: PTA-9387

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/109347 A2 (REITER) 27 September 2007 (27.09.2007), para [0005], [0088].	1 and 2
A	KIM, et al. N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility. J of Cell Biology, Vol 151, No 6, pages 1193- 1205. 11 December 2000 (11.12.2000)	1 and 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2009 (16.08.2009)

Date of mailing of the international search report

04 SEP 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/39526

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1, 2, directed to a first hybridoma cell line, ATCC Accession No. PTA-9387, and antibodies produced by the cell line.
Group II: claims 3, 4, directed to a second hybridoma cell line, ATCC Accession No. PTA-9388, and antibodies produced by the cell line.
Group III: claims 5-7 and 11-32, directed to an antibody that binds to domains 1-3 of N-cadherin.
Group IV: claims 8-32 directed to an antibody that binds to domain 4 of N-cadherin.
Group V: claim 33, directed to a method of identifying an anti-N-cadherin antibody or a compound that inhibits the growth of cancer cells in a patient.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 and 2

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

The inventions listed as Groups I - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of the claims of Groups I and II are particular, but different hybridoma cell lines, and antibodies produced by those cell lines. The special technical feature of the claims of Groups III and IV is an antibody that binds to domains 1-3 of N-cadherin, or domain 4 of N-cadherin, respectively. The special technical feature of the Group V claims is a method of identifying an anti-N-cadherin antibody or a compound that inhibits the growth of cancer cells in a patient.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to antibodies to N-cadherin. Groups I and III share a further common technical element of antibodies directed to binding domains 1-3 of N-cadherin. Groups II and IV share a further technical commonality of antibodies being directed to binding to domain 4 of N-cadherin. Note that, based on claims 5 and 8, respectively, the antibodies or fragments thereof which are claimed under Groups III and IV are not necessarily the same antibodies as those produced by the indicated cell lines (associated with Groups I and II, respectively), nor do the antibodies of Groups III and IV specifically bind to the same epitopes as the antibodies produced by the indicated cell lines, but only bind to the same domains of the target protein as the antibodies produced by the indicated cell lines. Therefore, these common technical elements do not represent a same or corresponding special technical feature. Further, common technical elements of the above Groups do not represent an improvement over the prior art of the article entitled "N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility" by Kim et al. which teaches antibodies which bind to either domain 1, or domain 4 of N-cadherin. (see pg. 1194; col 1 "The binding sites for most mAbs that block the adhesive function of E-, P-, and N-cadherin have been mapped to EC-1"; wherein EC-1 is applicants' domain 1; pg. 1203, col 2 "we produced a mAb that binds EC-4 of N-cadherin"; wherein EC-4 is applicants' domain 4; and pg. 1195, col 2, para 4 "A 300-.mu.l aliquot of cell extract was incubated with 300 .mu.l hybridoma supernatant for 30 min at 4.degree.C). Therefore, the inventions of Groups I-V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 2307K-1894-2	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2009/039526	International filing date (<i>day/month/year</i>) 03 April 2009 (03.04.2009)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 04 April 2008 (04.04.2008)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|---|
| ☒ | Box No. I | Basis of the report |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☐ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☒ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☐ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70		Date of issuance of this report 05 October 2010 (05.10.2010) Authorized officer Beate Giffo-Schmitt e-mail: pt03.pct@wipo.int
---	--	--

Form PCT/IB/373 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: CHUAN GAO TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR SAN FRANCISCO, CA 94111		Date of mailing (day/month/year) 04 SEP 2009
Applicant's or agent's file reference 2307K-1894-2		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
International application No. PCT/US 09/39526	International filing date (day/month/year) 03 April 2009 (03.04.2009)	Priority date (day/month/year) 04 April 2008 (04.04.2008)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(8) - C12N 5/00; C07K 16/00 (2009.01) USPC - 435/326, 346; 530/387.1		
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
☐ Box No. II Priority
☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No. IV Lack of unity of invention
☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI Certain documents cited
☐ Box No. VII Certain defects in the international application
☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Date of completion of this opinion 16 August 2009 (16.08.2009)	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	---	--

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/39526

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:
- a. type of material
- ☐ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☐ on paper
- ☐ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 09/39526

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1, 2, directed to a first hybridoma cell line, ATCC Accession No. PTA-9387, and antibodies produced by the cell line.

Group II: claims 3, 4, directed to a second hybridoma cell line, ATCC Accession No. PTA-9388, and antibodies produced by the cell line.

Group III: claims 5-7 and 11-32, directed to an antibody that binds to domains 1-3 of N-cadherin.

Group IV: claims 8-32 directed to an antibody that binds to domain 4 of N-cadherin.

Group V: claim 33, directed to a method of identifying an anti-N-cadherin antibody or a compound that inhibits the growth of cancer cells in a patient.

The inventions listed as Groups I - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of the claims of Groups I and II are particular, but different hybridoma cell lines, and antibodies produced by those cell lines. The special technical feature of the claims of Groups III and IV is an antibody that binds to domains 1-3 of N-cadherin, or domain 4 of N-cadherin, respectively. The special technical feature of the Group V claims is a method of identifying an anti-N-cadherin antibody or a compound that inhibits the growth of cancer cells in a patient.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to antibodies to N-cadherin. Groups I and III share a further common technical element of antibodies directed to binding domains 1-3 of N-cadherin. Groups II and IV share a further technical commonality of antibodies being directed to binding to domain 4 of N-cadherin. Note that, based on claims 5 and 8, respectively, the antibodies or fragments thereof which are claimed under Groups III and IV are not necessarily the same antibodies as those produced by the indicated cell lines (associated with Groups I and II, respectively), nor do the antibodies of Groups III and IV specifically bind to the same epitopes as the antibodies produced by the indicated cell lines, but only bind to the same domains of the target protein as the antibodies produced by the indicated cell lines. Therefore, these common technical elements do not represent a same or corresponding special technical feature. Further, common technical elements of the above Groups do not represent an improvement over the prior art of the article entitled "N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility" by Kim et al. which teaches antibodies which bind to either domain 1, or domain 4 of N-cadherin. (see pg. 1194; col 1 "The binding sites for most mAbs that block the adhesive function of E-, P-, and N-cadherin have been mapped to EC-1"; wherein EC-1 is applicants' domain 1; pg. 1203, col 2 "we produced a mAb that binds EC-4 of N-cadherin"; wherein EC-4 is applicants' domain 4; and pg. 1195, col 2, para 4 "A 300-.mu.l aliquot of cell extract was incubated with 300 .mu.l hybridoma supernatant for 30 min at 4.degree.C). Therefore, the inventions of Groups I-V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1 and 2

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/39526

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b4s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 and 2	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	1 and 2	YES
	Claims	NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 and 2	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1 and 2 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest the hybridoma cell line deposited as ATCC Accession No. PTA-9387 and the antibody produced therefrom.

The closest prior art, WO 2007/109347 A2 to REITER, discloses a hybridoma and antibody produced therefrom as they relate cadherin (para [0005], [0088]). However, Reiter does not teach or fairly suggest a hybridoma cell line deposited as ATCC Accession No. PTA-9387 and an antibody produced therefrom.

Claims 1 and 2 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

**NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA CÁNCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE
CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reclama prioridad de la
solicitud de patente de los E.U.A. No. de Serie 61/042,604,
presentada en abril 4, 2008, y la solicitud de patente de los
E.U.A. No. de Serie 61/113,053, presentada en noviembre 10,
2008, los contenidos de las cuales aquí se incorporan por
10 referencia en su totalidad.

**DECLARACIÓN RESPECTO A DERECHOS DE INVENCIONES REALIZADAS BAJO
DESARROLLO O INVESTIGACIÓN AUSPICIADOS FEDERALMENTE**

 La presente invención en parte fue soportada por
NIH/NCI SOMI Training Grant R25 CA 098010 y NIH/NCI UCLA
15 Prostate SPORE, P50 CA 092131. El gobierno tiene ciertos
derechos respecto a esta invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

 El cáncer de próstata es la más común malignidad y
la segunda causa principal de muerte relacionada a cáncer en
20 hombres americanos. El cáncer de próstata es una enfermedad
biológica y clínicamente heterogénea. Una mayoría de los
hombres con esta malignidad alojan tumores de lento
crecimiento que pueden no impactar en la extensión debida
natural de un individuo, mientras que otros son impactados por
25 tumores metastásicos rápidamente progresivos. La prueba de
detección de PSA está limitada por una falta de especificidad
y una incapacidad por pronosticar que pacientes están en
riesgo por desarrollar enfermedad metastásica refractaria de
hormonas. Recientes estudios que se avocan a un menor umbral
30 de PSA para diagnóstico, pueden incrementar el número de
diagnóstico de cáncer de próstata y complicar adicionalmente

la identificación de pacientes con cánceres indolentes contra agresivos (Punglia et al., *N Engl J Med*, 349: 335-342 (2003)). Nuevos marcadores de suero y tejido que correlacionan con el resultado clínico o identifican pacientes con enfermedad

5 agresiva potencialmente se requieren en forma urgente (Welsh et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3410-3415 (2003)).

Estudios de perfilado de expresión recientes sugieren que las firmas de expresión para tumores metastásicos contra no-metastásicos pueden residir en el tumor primario

10 (Ramaswamy et al., *Nat Genet*, 33: 49-54 (2003); Sotiriou et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10393-10398 (2003)). Características adicionales que predisponen a tumores a metástasis en órganos específicos también pueden estar presentes con cierta frecuencia en el tumor primario (Kang et

15 al., *Cancer Cell*, 3: 537-549 (2003)). Estas observaciones recientes sugieren que marcadores novedosos de cáncer de próstata refractario pre-hormona o pre-metastásico pueden ser identificados en la etapa temprana de la enfermedad. Estos marcadores también juegan un papel en la biología de avance de

20 cáncer de próstata refractario de hormona o metastásico. Recientes ejemplos de genes presentes en tumores primarios que se correlacionan con el resultado y juegan un papel en la biología de progreso de cáncer de próstata incluyen EZH2 y LIM quinasa (Varambally et al., *Nature*, 419: 624-629 (2002);

25 Yoshioka et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7247-7252 (2003)). Sin embargo, ninguno de estos dos genes es secretado.

A fin de identificar nuevos marcadores de tejido o suero candidato de cáncer de próstata refractario de hormona,

30 comparamos perfiles de expresión de gen de xenoinjertos de cáncer de próstata refractario de hormona y dependiente de

hormona apareada. El xenoinjerto LAPC-9 se estableció de una metástasis de hueso osteoblástico y progresa desde una dependencia de andrógeno a independencia después de castración en ratones inmuno deficientes (Craft et al., *Cancer Research*, In Press (1999)). Se ha empleado previamente para identificar blancos o dianas terapéuticas candidato en cáncer de próstata. Genes expresados diferencialmente se validaron y después se examinaron para homología de secuencia a proteínas de superficie celular o secretadas. La identificación, caracterización y validación inicial de N-cadherina, que se expresa tanto en cáncer de próstata refractario de hormona como en cáncer de vejiga, se ha reportado previamente (WO/2007/109347).

Previamente discutimos nuestra identificación de N-cadherina como un blanco o diana terapéutico o de diagnóstico putativo en cánceres de próstata y vejiga (WO/2007/109347). Nuestra descripción previa demuestra expresión significativa del objetivo en tumores de vejiga y próstata de alto riesgo y avanzados y mostró que la expresión de la diana se asocia con deficiente pronóstico y avance a independencia de andrógeno. Aunque ha habido especulación previa de que N-cadherina puede ser una diana de terapia útil, el único fármaco existente era un antagonista péptido, que no muestra ninguna actividad preclínica contra cáncer de próstata. Para nuestro conocimiento, nuestra invención proporciona los primeros anticuerpos monoclonales que son activos contra cánceres que expresan el objetivo o diana. Además, el antagonista N-cadherina existente hace blanco solo al primer dominio extracelular de la proteína. Describimos anticuerpos que hacen blanco al primer y cuarto dominios extracelulares. Todos tienen actividad antitumor significativa. Hasta nuestro

mejor conocimiento, esta es la primera descripción del concepto de hacer diana al cuarto dominio extracelular. Nuestros anticuerpos pueden emplearse como agentes sencillos, en combinación, y también conceptualmente como agentes que
5 pueden combinarse con antagonistas de rutas paralelas o corriente abajo a N-cadherina.

La invención abarca múltiples anticuerpos monoclonales contra el primer y cuarto dominios extracelulares de la proteína N-cadherina. Estos anticuerpos bloquean
10 crecimiento de tumor, angiogénesis y metástasis en modelos in vivo de próstata y otros cánceres. Funcionan al bloquear las rutas de transducción de señal N-cadherina que son críticas para crecimiento de tumor, invasión, angiogénesis y metástasis. Los anticuerpos también pueden ser útiles para
15 formación de imagen in vivo de tumores positivos de N-cadherina y/o para diagnóstico y/o pronóstico de tejido.

La invención puede practicarse sola como anticuerpos sencillos para tratar o evitar crecimiento de tumor y metástasis. Pueden emplearse como adyuvantes o como agentes
20 terapéuticos para tumores existentes. Pueden emplearse en combinación para bloquear múltiples dominios de la proteína N-cadherina. También pueden emplearse en combinación con quimioterapia u otros agentes de cáncer dirigidos, particularmente aquellos que hacen blanco a rutas de
25 transducción de señal sinérgicas o aquellos que hacen blanco en rutas corriente abajo o corriente arriba involucradas en transducción de señal mediada por N-cadherina.

Actualmente no hay terapias o diagnósticos aprobados que hacen blanco en N-cadherina. El único fármaco que hace
30 blanco a estas rutas no ha sido altamente exitoso en pruebas Fase II y no ha mostrado actividad en los modelos preclínicos

en la que nuestra invención es activa contra??active against, sugiriendo la clara superioridad de nuestro enfoque y nuestros agentes.

De acuerdo con esto, la invención proporciona composiciones y métodos que hacen blanco en N-Cadherina en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de cánceres que expresan N-Cadherina incluyendo, pero no limitados a cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9387 y un anticuerpo producido por esta línea celular de hibridoma, así como otra línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9388 y un anticuerpo producido por esta línea celular de hibridoma. También se proporciona un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar a dominios 1-3 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, *in vivo* o *in vitro*, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección de Cultivo Tipo Americano (American Type Culture Collection) que tiene el No. de Acceso ATCC PTA-9387, o un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar al dominio 4 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, *in vivo* o *in vitro*, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene el No. de Acceso ATCC PTA-9388. Este anticuerpo puede ser humanizado o totalmente humano; o puede ser un diacuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

En un segundo aspecto, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células de cáncer en un paciente. El método comprende la etapa de: administrar un

anticuerpo (o su fragmento) de esta invención a un paciente bajo condiciones suficientes para ligar el anticuerpo (o su fragmento) a las células de cáncer, que expresan o sobre-expresan N-cadherina. El anticuerpo (o su fragmento) inhibe el crecimiento de células de cáncer por (a) activar o inhibir señalización y transcripción NF kappa- β ; (b) activar o inhibir internalización de N-cadherina; (c) activar o inhibir PI3 quinasa o la ruta Akt; (d) activar o inhibir señalización de β -catenina; (e) bloquear heterodimerización de N-cadherina con FGFR u otro receptor de tirosina quinasa; o (f) bloquear o mejorar la ruptura por ADAM10 u otra metalopeptidasa. En algunas modalidades, las células de cáncer son células de cáncer urogenitales, células de cáncer de próstata, o células de cáncer de vejiga.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un paciente de cáncer. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba de un individuo con riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia o cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo que se conoce negativo para el cáncer; de esta manera diagnosticando el cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un subconjunto de células, o se sobre-expresa; y (c) administrar una cantidad efectiva de anticuerpo de N-cadherina (o su fragmento) de esta invención al individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina.

En algunas modalidades, la muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga. En algunas modalidades, el

cáncer es cáncer de próstata o cáncer de vejiga, o puede ser un cáncer metastásico. En algunas modalidades, el anticuerpo (o su fragmento) bloquea el cáncer de próstata refractario de hormona, o el anticuerpo bloquea células madre de cáncer. El anticuerpo en algunos casos es un anticuerpo monoclonal, un scFv, o un diacuerpo. En otras modalidades, la muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar a un paciente de cáncer. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba de un individuo con riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia o cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido control de un individuo que se conoce es negativo para el cáncer al contactar una muestra con una cantidad efectiva del anticuerpo N-cadherina (o su fragmento) de esta invención; de esta manera diagnosticando el cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un sub-conjunto de células, o se sobre-expresa.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar células madre de cáncer. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba de un individuo con riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo que se conoce es negativo para el cáncer; en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un sub-

conjunto de células madre y no se sobre-expresa, utilizando el anticuerpo (o su fragmento) de esta invención. En algunas modalidades, la muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de próstata, un cáncer de vejiga, un cáncer de próstata refractario de hormona o un cáncer metastásico.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para identificar un anticuerpo anti-N-cadherina o un compuesto que inhibe el crecimiento de células de cáncer en un paciente. El método comprende las etapas de: (i) poner en contacto el compuesto candidato o anticuerpo con una célula que expresa o sobre-expresa un polipéptido de N-cadherina; y (ii) determinar el efecto funcional del compuesto candidato o anticuerpo sobre el polipéptido de N-cadherina al determinar si el compuesto o anticuerpo: (a) activa o inhibe señalización y transcripción NF kappa- β ; (b) activa o inhibe internalización de N-cadherina; (c) activa o inhibe PI3 quinasa o ruta Akt; (d) activa o inhibe señalización de β -catenina; (e) bloquea la heterodimerización de N-cadherina con FGFR u otro receptor de tirosina quinasa; o (f) bloquea o mejora la ruptura por ADAM10 u otra metalopeptidasa. Si el compuesto candidato o anticuerpo muestra que exhibe actividad en cualquiera de (a)-(f), el anticuerpo o compuesto se considera un anticuerpo anti-N-Cadherina o un compuesto que inhibe el crecimiento de cánceres que expresan N-Cadherina en un paciente. Por ejemplo, el anticuerpo o compuesto se consideró un anticuerpo anti-N-Cadherina o un compuesto que inhibe el crecimiento de cánceres que expresan N-Cadherina en un paciente cuando el anticuerpo o compuesto inhibe la señalización o transcripción NF kappa- β ; o cuando el anticuerpo o compuesto inhibe internalización de N-cadherina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Modelo de señalización de N-Cadherina en cáncer de próstata.

Figura 2. N-Cadherina activa NF- $\gamma\beta$.

5 **Figura 3.** N-Cadherina activa NF- $\gamma\beta$.

Figura 4. N-Cadherina se expresa en la superficie celular de células C1.

Figura 5. NF- $\gamma\beta$ localiza al núcleo en células positivas de N-Cadherina (C1).

10 **Figura 6.** Expresión de N-Cadherina resulta en inducción de IL-6, IL-8, TGF β 2, y bcl-2.

Figura 7: Correlación de genes inducidos con nivel de N-cadherina.

15 **Figura 8:** Interferencia génica de N-Cadherina lleva a regulación a la baja de IL-6 y IL-8.

Figura 9. Actividad NF- $\gamma\beta$ después de tratamiento con anticuerpo de N-cadherina.

Figura 10. N-Cadherina en células PC3: incubación de anticuerpo de 48-horas.

20 **Figura 11.** La interferencia génica de N-Cadherina lleva a regulación a la baja de Akt activado.

Figura 12. Anticuerpos específicos de N-Cadherina activan, después regulan a la baja la activación de Akt.

25 **Figura 13.** Análisis FACS de clones de anticuerpo que hacen blanco al primer dominio extracelular de la proteína N-cadherina.

Figura 14. Análisis FACS de clones de anticuerpo que hacen blanco al cuarto dominio extracelular de la proteína N-cadherina.

30 **Figura 15.** Análisis FACS de clones de anticuerpo N-Cadherina monoclonal purificados.

Figura 16. Ensayo de invasión in vitro de clones de anticuerpo N-Cadherina monoclonal.

Figura 17. Curva de crecimiento de tumores nulos de N-Cadherina bajo tratamiento por anticuerpos contra N-cadherina, 1H7 y EC4, mostrando ningún efecto inhibitorio significativo (17a). La curva de crecimiento de tumor de células de cáncer de próstata PC3 tratadas con los mismos anticuerpos, demuestran efectividad en la inhibición de crecimiento (17b). La curva de crecimiento de tumores PC3 establecidos grandes bajo tratamiento por los anticuerpos 1H7 y EC4 (17c). Curva de crecimiento a largo plazo de tumores PC3 bajo tratamiento por el anticuerpo EC4 (17d).

Figura 18. Experimento in vivo que muestra efecto de anticuerpos contra N-cadherina.

Figura 19. (a) Tinción inmunohistoquímica de cáncer de próstata LAPC9 independiente de andrógeno; (b) Tratamiento de tumores LAPC-9 dependientes e independientes de andrógeno con anticuerpos de N-cadherina.

Figura 20. Curva de Crecimiento de Tumor de células LAPC9AI clasificadas y no clasificadas.

Figuras 21 y 22. Resultados FACS en tumores clasificados de N-Cadherina procesados.

Figura 23. Curvas de crecimiento de tumores LNCaP-C1, que muestran efectos inhibitorios de anticuerpos de N-cadherina.

Figura 24. Anticuerpos de N-cadherina inhibe el crecimiento de tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos (24a) y tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos grandes.

Figura 25. Inhibición de crecimiento de tumor PC3 en ratones desnudos por anticuerpo EC4 en una forma

correlacionada con dosis.

Figura 26. Anticuerpos de N-Cadherina 1H7 y EC4 muestran un efecto inhibitorio en el crecimiento de tumor dependiente de andrógeno LAPC-9 en dos estudios en donde el progreso en tumor fue seguido por hasta 45 días (26a) y 70 días (26b).

Figura 27. Células clasificadas N-Cadherina muestran una ventaja de crecimiento en ratones SCID castrados.

Figura 28. Correlación entre expresión de N-cadherina y nivel de receptor de andrógeno en pasajes sucesivos de células de tumor LAPC9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a anticuerpos monoclonales novedosos que hacen blanco a la proteína de superficie celular N-Cadherina para terapia de cánceres que expresan N-cadherina. Los cánceres pueden ser cáncer de próstata, cáncer de vejiga, u otros cánceres que expresan N-cadherina.

Esta invención también se refiere a métodos para tratar cánceres utilizando anticuerpos que hacen blanco en N-cadherina. Los inventores han descubierto que los anticuerpos pueden funcionar al activar o inhibir señalización y transcripción de NF kappa- β , o al activar o inhibir internalización de N-cadherina, o al activar o inhibir la ruta Akt o PI3 quinasa, o al activar o inhibir la señalización de β -catenina, o al bloquear la heterodimerización de N-cadherina con FGFR u otro receptor de tirosina quinasa; o al bloquear o mejorar el rompimiento por ADAM10 u otra metalopeptidasa. La Figura 1 es un resumen de transducción de señal mediada por N-cadherina. La Figura 1 muestra la activación de las rutas NF-kappa β , Akt, y β -catenina. Los inventores reportan evidencia que muestra que los anticuerpos de N-Cadherina funcionan

alterando una o más de estas rutas.

Definiciones

"N-Cadherina y E-Caderina" se refieren a ácidos nucleicos, por ejemplo gen, pre-ARNm, ARNm y polipéptidos, variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecies que: (1) tiene una secuencia de aminoácido que es mayor que aproximadamente 60% de identidad de secuencia de aminoácido, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, de preferencia 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor identidad de secuencia de aminoácido, de preferencia sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácido, a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia respectiva o una secuencia de aminoácido aquí descrita, por ejemplo como se ilustra con Nos. de Acceso GenBank NM_001792 (ARNm N-cadherina), NP_001783 (proteína N-cadherina), NM_004360 (ARNm E-Caderina), y NP_004351 (proteína E-Caderina); (2) ligan específicamente a anticuerpos, por ejemplo anticuerpos policlonales, desarrollados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácido de referencia como se ilustra el No. de Acceso GenBank NP_001783 (proteína N-cadherina) o NP_004351 (proteína E-Caderina); sus fragmentos respectivos inmunogénicos, y variantes modificadas de manera conservadora respectivas de los mismos; (3) hibridizar específicamente bajo severas condiciones de hibridización a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido de referencia como se ilustra en el No. de Acceso GenBank NP_001783 (proteína N-cadherina) o NP_004351 (proteína E-Caderina), respectivamente y sus variantes respectivas modificadas de manera conservadora; (4) tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene más de aproximadamente 95%, de preferencia más de aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99%

o superior identidad de secuencia de nucleótidos, de preferencia sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, o más nucleótidos, a una secuencia de ácido nucleico de referencia como se muestra en el No. de Acceso GenBank NM_001792 (ARNm N-cadherina) o NM_004360 (ARNm E-Caderina). Una secuencia polipéptido o polinucleótido típicamente es de un mamífero incluyendo, pero no limitados a primate, por ejemplo humano; roedor, e.g., rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier otro mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención incluyen tanto moléculas de origen natural como recombinantes.

"Cáncer" se refiere a cánceres humanos y carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, etc., incluyendo tumores sólidos y cánceres linfoides, de riñón, de mama, pulmón, riñón, vejiga, colon, de ovarios, próstata, páncreas, estómago, cerebro, cabeza y cuello, piel, uterino, testicular, esófago y cáncer de hígado, linfoma, incluyendo linfoma no Hodgkin y de Hodgkin, leucemia, y mieloma múltiple. "Cáncer urogenital" se refiere a cánceres humano de tejidos genitales y de tracto urinario, incluyendo pero no limitados a tejidos de riñón, vejiga, tracto urinario, uretra, próstata, pene, testículos, vulva, vagina, cervicales y ovarios.

El cáncer a tratar aquí puede ser uno caracterizado por excesiva activación de N-cadherina. En forma alterna, el cáncer a tratarse aquí puede ser aquel en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o uno en donde la proteína N-cadherina se expresa por un sub-conjunto de células, y en donde la proteína N-cadherina no se sobreexpresa. En una modalidad de la invención, un ensayo de diagnóstico o pronóstico se realizará para determinar si el

cáncer del paciente se caracteriza por expresión de N-cadherina. Diversos ensayos para determinar esta amplificación/expresión se contemplan e incluyen la inmunohistoquímica, FISH y ensayos de antígeno circulante, transferencia southern, o técnicas PCR. Aún más, la expresión o amplificación de N-cadherina puede evaluarse utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo al administrar una molécula (tal como un anticuerpo) que liga la molécula a detectarse y se etiqueta con una etiqueta detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo) y exploración externa del paciente para localización de la etiqueta. En algunas modalidades, el cáncer a tratar todavía no es invasivo, pero expresa N-cadherina.

Cánceres "resistentes a terapia", células de tumor, y tumores se refieren a cánceres que se han vuelto resistentes o refractarios a cualquiera o ambas terapias de cáncer mediadas por apoptosis (*por ejemplo*, a través de señalización de células receptoras de muerte, por ejemplo receptores ligando Fas, receptores TRAIL, TNF-R1, fármacos quimioterapéuticos, radiación) y terapias de cáncer sin mediar apoptosis (*por ejemplo*, fármacos tóxicos, productos químicos), incluyendo quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia e inmunoterapia.

"Sobre-expresión" se refiere a ARN o expresión de proteína de N-cadherina, LY6-E y E-Cadherina en una muestra de tejido de prueba que es significativamente superior a expresión de ARN o proteína de N-cadherina, LY6-E y E-Cadherina, respectivamente, en una muestra de tejido de control. En una modalidad, la muestra de tejido es autóloga. Muestras de tejido de prueba canceroso (por ejemplo, vejiga, próstata) asociadas con invasividad o capacidad invasora,

metástasis, independiente de hormona (por ejemplo, independencia de andrógeno), o resistencia a tratamiento o una probabilidad incrementada de los mismos típicamente tiene al menos una expresión dos veces superior de N-Cadherina o ARNm LY6-E o proteína, a menudo hasta tres, cuatro, cinco, ocho, diez o más expresiones superiores de N-Cadherina o LY6-E en comparación con tejidos de cáncer de pacientes quienes son menos probables que progresen a metástasis o a muestras de tejido normales (es decir, sin-cáncer). Estas diferencias pueden ser fácilmente aparentes cuando se ven las bandas de geles con muestras de control y prueba cargadas aproximadamente en forma similar. Cánceres de próstata que expresan cantidades incrementadas de N-Cadherina o Ly6-E son más probable que se vuelvan invasivos, se sometan a metástasis o avancen a cáncer refractario de tratamiento o independiente de andrógeno. Diversos cortes son pertinentes para positividad de N-Cadherina o Ly6-E, ya que es posible que un pequeño porcentaje de células positivas Ly6-E o N-Cadherina en tumores primarios puedan identificar tumores con un alto riesgo para recurrencia y metástasis. Los términos "sobre-expresa", "sobre-expresión" o "sobre-expresado" en forma intercambiable se refieren a un gen que se transcribe o traduce a un nivel mayor detectable, como usualmente en una célula de cáncer, en comparación con una célula normal. La sobre-expresión por lo tanto se refiere tanto a sobre-expresión de proteína como ARN (debido a incrementada transcripción, procesamiento post transcripción, traducción, procesamiento post traducción, estabilidad alterada, y degradación de proteína alterada), así como sobre-expresión local debida a patrones de tráfico de proteínas alterados (incrementada localización nuclear), y actividad funcional

aumentada, por ejemplo, como en hidrólisis de enzima incrementada del sustrato. La sobre-expresión también puede ser por 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con una célula normal o célula de comparación (por ejemplo una célula BPH).

Los términos "cáncer que expresa N-cadherina" y "cáncer asociado con la expresión de N-cadherina" en forma intercambiable se refieren a células de cáncer o tejidos que expresa N-Cadherina de acuerdo con la definición anterior.

Los términos "antígeno asociado con cáncer" o "marcador específico de tumor" o "marcador de tumor" en forma intercambiable se refieren a una molécula (típicamente proteína, carbohidrato o lípido) que de preferencia se expresa en una célula de cáncer en comparación con una célula normal, y que es útil para hacer blanco en forma preferencial de un agente farmacológico a la célula de cáncer. Un marcador o antígeno puede expresarse en la superficie celular o en forma intracelular. A menudo, un antígeno asociado con cáncer es una molécula que se expresa o estabiliza con mínima degradación en una célula de cáncer en comparación con una célula normal, por ejemplo expresión de 2 veces, expresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. A menudo, un antígeno asociado con cáncer es una molécula que se sintetiza en forma inapropiada en la célula de cáncer, por ejemplo una molécula que contiene delecciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. A menudo, un antígeno asociado con cáncer se expresará en forma exclusiva en una célula de cáncer y no sintetizará o expresará en una célula normal. Marcadores de tumor de superficie celular ejemplificados incluyen las proteínas c-erbB-2 y el receptor de factor de crecimiento

epidérmico humano (HER) para cáncer de mama, PSMA para cáncer de próstata y carbohidrato mucinas en numerosos cánceres, incluyendo de mama, de ovarios y colorectal. Marcadores de tumor intracelular ejemplares incluyen, por ejemplo, proteínas de ciclo celular o supresor de tumor mutado tal como p53.

E-Cadherina por el contrario esta sub-expresada típicamente en muestras de tejido cancerosas en muestras de tejido de cáncer de paciente que probablemente se volverán invasivos, se someterán a metástasis, o avanzaran a cáncer refractario a tratamiento o independiente a andrógeno. Esta sobre expresión puede ser de dos veces, tres veces, cuatro veces o al menos cinco veces. Estas diferencias pueden ser fácilmente aparentes cuando se ven las bandas de geles con muestras de control y de prueba cargadas en forma similar aproximadamente. Los valores de N-cadherina/E-Cadherina combinados en cánceres que probablemente se vuelvan invasivos, se sometan a metástasis, o avancen a cáncer refractario de tratamiento o independiente de andrógeno, por lo tanto son incluso mayores y pueden ser de al menos mayores dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces o veinte veces. Diversos cortes son pertinentes para negatividad de e-Caderina/ positividad de N-cadherina, ya que es posible que un pequeño porcentaje de células positivas de N-Cadherina en tumores primarios pueden identificar tumores con un alto riesgo por recurrencia y metástasis.

Un "agonista" se refiere a un agente que liga a un polipéptido o polinucleótido de la invención, estimula, aumenta, activa, facilita, mejora la activación, sensibiliza, expresa o favorece la expresión de la actividad o expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención.

Un "antagonista" se refiere a un agente que inhibe

la expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención o liga a, parcialmente o totalmente bloquea estímulo, disminuye, evita, retrasa la activación, inactiva, desensibiliza o regula a la baja la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención.

"Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de expresión o de actividad, se emplean para referirse a moléculas inhibitorias, de activación o moduladoras, respectivamente, identificadas utilizando ensayos in vitro e in vivo para expresión o actividad, por ejemplo ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Inhibidores son agentes que, por ejemplo inhibe la expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención o ligan a, parcial o totalmente bloquean el estímulo o actividad enzimática, disminuyen, evitan, retrasan la acción, inactivan, desensibilizan o regulan a la baja la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención, por ejemplo antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo inducen o activan la expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención o ligan a, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, mejoran la activación o actividad enzimática, sensibilizan o expresan o favorecen la expresión de la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención, por ejemplo agonistas. Moduladores incluyen ligandos de origen natural y sintéticos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas y semejantes. Ensayos para identificar inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo aplicar compuestos moduladores putativos a células, en la presencia o ausencia de un polipéptido o polinucleótido de la invención y después determinar los efectos funcionales en

un polipéptido o polinucleótido de la actividad de la invención. Muestras o ensayos que comprende un polipéptido o polinucleótido de la invención que se tratan con activador potencial, inhibidor o modulador, se comparan para controlar muestras sin el inhibidor, activador o modulador para examinar la extensión del efecto. Muestras de control (sin tratar con moduladores) se les asigna un valor de actividad relativa de 100%. La inhibición se logra cuando el valor de actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención respecto al control es de aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25-1%. La activación se logra cuando el valor de actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención respecto al control es 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500% o 1000-3000% superior.

El término "compuesto de prueba" o "candidato de fármaco" o "modulador" o sus equivalentes gramaticales como se emplea aquí describen cualquier molécula, ya sea de origen natural o sintética, por ejemplo proteína, oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácido de longitud, de preferencia de aproximadamente 10 a 20 ó 12 a 18 aminoácido de longitud, de preferencia 12, 15 ó 18 aminoácido de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, lípido, ácido graso, polinucleótido, iARN, ARNpi, anticuerpo, oligonucleótido, etc. El compuesto de prueba puede estar en la forma de una biblioteca de compuestos de prueba, tales como una biblioteca combinatoria o al azar que proporciona un intervalo suficiente de diversidad. Los compuestos de prueba opcionalmente están ligados a un socio de fusión, por ejemplo compuestos diana, compuestos dirigidos, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizantes, compuestos direccionales y otras porciones

funcionales. Convencionalmente, nuevas entidades químicas con propiedades útiles se generan al identificar un compuesto de prueba (denominado un "compuesto principal") con alguna propiedad o actividad deseable, por ejemplo actividad inhibitoria, creando variantes del compuesto principal, y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. A menudo, se emplean métodos de evaluación de alto rendimiento (HTS = high throughput screening) para este análisis.

Una "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula orgánica, ya sea de origen natural o sintética, que tiene un peso molecular mayor a aproximadamente 50 Daltons y menos de aproximadamente 2500 Daltons, de preferencia menos de aproximadamente 2000 Daltons, de preferencia entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 Daltons, más preferible entre aproximadamente 200 a aproximadamente 500 Daltons.

Agentes citotóxicos, incluyen fármacos "específicos de ciclo celular" o "antimitóticos" o "de interacción con citoesqueleto". Estos términos se refieren en forma intercambiable a cualquier agente farmacológico que bloquea células en mitosis. Estos agentes son útiles en quimioterapia. En general, fármacos-específicos-del ciclo-celular ligan a la proteína de citoesqueleto tubulina y bloquean la capacidad de la tubulina?? para polimerizarse en microtúbulos, resultando en el freno de división celular en la metafase.

Fármacos-específicos-de ciclo-celular ejemplificados incluyen vinca alcaloides, taxanos, colchicina y podofilotoxina. Vinca alcaloides ejemplificados incluyen vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. Taxanos ejemplificados incluyen paclitaxel y docetaxel. Otro ejemplo

de un fármaco que interactúa con citoesqueleto incluye 2-metoxiestradiol.

Un "ARNpi (siRNA)" o "iARN (RNAi)" se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN de doble hebra, este ARN de
5 doble hebra tiene la capacidad para reducir o inhibir la expresión de un gen o gen objetivo cuando el ARNpi expresado en la misma célula que el gen o gen objetivo. "ARNpi" o "iARN" de esta manera se refieren al ARN de doble hebra formado por las hebras complementarias. Las porciones
10 complementarias del ARNpi que hibridizan para formar la molécula de doble hebra típicamente tienen identidad substancial o completa. En una modalidad, un ARNpi se refiere a un ácido nucleico que tiene identidad substancial o completa a un gen objetivo y forma un ARNpi de doble hebra.
15 Típicamente, el ARNpi es al menos de aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNpi de doble hebra tiene de 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNpi de doble hebra tiene aproximadamente 15-50 pares base de longitud, de preferencia
20 aproximadamente 20-30 nucleótidos base preferibles, de preferencia aproximadamente 20-25 o aproximadamente 24-29 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud.

El diseño y constitución de moléculas de ARNpi y
25 vectores son bien conocidos por aquellos con destreza ordinaria en la especialidad. Por ejemplo, un proceso eficiente para diseñar un ARNpi conveniente es empezar en el codón de inicio AUG de la transcripción ARNm (mRNA) (por ejemplo, ver Figura 5) y explorar por secuencias dinucleótido
30 AA (ver, Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888 (2001). Cada AA y los nucleótidos adyacentes 3' son sitios dirigidos ARNpi

potenciales. La longitud de la secuencia del sitio adyacente determinara la longitud del ARNpi. Por ejemplo, 19 sitios adyacentes darán una ARNpi de 21 nucleótidos de longitud. ARNpi con dinucleótidos UU 3' salientes son a menudo los más efectivos. Este enfoque también es compatible con utilizar ARN pol III para transcribir ARNpi de horquilla. ARN pol III termina la transcripción en tractos poli(T) de 4 a 6 polinucleótidos para crear moléculas ARN que tienen una cola corta poli(U). Sin embargo, ARNpis con otras salientes dinucleótidos 3' terminales también pueden inducir efectivamente iARN y la secuencia puede seleccionarse en forma empírica. Para selectividad, secuencias dirigidas con más de 16-17 pares base contiguos de homología a otras secuencia de codificación pueden evitarse al realizar una búsqueda BLAST (ver, National Center for Biotechnology Information (NCBI) website: ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

El ARNpi puede ser administrado en forma directa o vectores de expresión de ARNpi pueden emplearse para inducir iARN pueden tener diferentes criterios de diseño. Un vector puede tener insertados dos repeticiones invertidas separadas por una corta secuencia espaciadora y que terminan con una sarta de T's que sirve para terminar la transcripción. La transcripción de ARN expresado se pronostica que pliega en un ARNpi de horquilla corto. La selección de la secuencia dirigida de ARNpi, la longitud de las repeticiones invertidas que codifican la raíz de una horquilla putativa, el orden de las repeticiones invertidas, la longitud y composición de la secuencia espaciadora que codifica el bucle de la horquilla, y la presencia o ausencia de salientes 5', pueden variar. Un orden preferido del cassette de expresión ARNpi es hebra sentido, corto espaciador y hebra anti-sentido. ARNpis de

horquilla con estas diversas longitudes de raíz??stem (por ejemplo, 15 a 30) puede ser conveniente. La longitud de los bucles que ligan hebras sentido y antisentido del ARNpi de horquilla puede tener longitudes variantes (por ejemplo, 3 a 9

5 nucleótidos, o más largos). Los vectores pueden contener promotores y mejoradores de expresión u otros elementos regulatorios que se enlazan en forma operativa con la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNpi. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN

10 necesarias para la expresión de una secuencia de codificación enlazada en forma operativa en un organismo hospedero particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de enlace de ribosoma.

15 Células eucarióticas se conoce que utiliza promotores señales de poliadenilación y mejoradores. Estos elementos de control pueden diseñarse para permitir al especialista desactivar o activar la expresión del gen al agregar o controlar factores externos a los cuales responden los elementos regulatorios.

20 La construcción de vectores convenientes que contienen la codificación de gen terapéutico deseado y secuencias de control que emplean técnicas de restricción y ligación estándar, que son bien comprendidas en la técnica (ver Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory

25 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)). Plásmidos aislados, secuencias de ADN u oligonucleótidos sintetizados se rompen, ajustan a la medida y vuelven a ligar en la forma deseada.

Ácido nucleico esta "enlazado operativamente" cuando

30 se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para un líder secretorio o

presecuencia esta enlazado operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o estimulante se enlaza operativamente con una secuencia de codificación si
 5 afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de enlace de ribosoma se enlaza operativamente con una secuencia de codificación si se ubica para facilitar la traducción. En general, "enlazado operativamente" significa que las secuencias de ADN que se enlazan están cerca entre si, y en el
 10 caso se un líder secretorio, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los estimulantes no tienen que ser contiguos. El enlace se logra al ligar en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, los enlazadores o adaptadores oligonucleótidos sintéticos se emplean de acuerdo
 15 con la práctica convencional.

"Determinar el efecto funcional" se refiere a ensayar un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que esta directa o indirectamente bajo la influencia de un polinucleótido o polipéptido de la invención, por ejemplo,
 20 medir efectos físicos y químicos o fenotípicos. Estos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido a aquellos con destreza en la especialidad, por ejemplo cambios en propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicos (por
 25 ejemplo, forma), cromatográficos o de solubilidad para la proteína; medir marcadores inducibles o activación de transcripción de la proteína; medir ensayos de enlace o actividad de enlace, por ejemplo enlace a anticuerpos; medir cambios en afinidad de enlace a ligando; medición de influjo
 30 de calcio; medición de la acumulación de un producto enzimático de un polipéptido de la invención o agotamiento de

un sustrato; cambios en actividad enzimática, por ejemplo actividad quinasa, medición de cambios en niveles de proteína de un polipéptido de la invención; medición de estabilidad de ARN; enlace de proteína G; fosforilación o desfosforilación de receptor acoplado a proteína G (GPCR = G-protein coupled receptor); transducción de señal, por ejemplo interacciones de receptor-ligando, concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, cAMP, IP3, o Ca^{2+} intracelular); identificación de expresión de gen reportero o corriente abajo (CAT, luciferasa, β -gal, GFP y semejantes), por ejemplo, mediante quimio-luminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, enlace de anticuerpo, marcadores inducibles y ensayos de enlace de ligando.

Muestras o ensayos que comprende un ácido nucleico o proteína aquí descrito que se tratan con un activador potencial, inhibidor o modulador, se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para examinar la extensión de inhibición. Muestras de control (sin tratar con inhibidores) se asignan un valor de actividad de proteína relativo de 100%. La inhibición se logra cuando el valor de actividad respecto al control es aproximadamente 80%, de preferencia 50%, más preferiblemente 25-0%. La activación se logra cuando el valor de actividad respecto al control (sin tratar con activadores) es 110%, más preferiblemente 150%, más preferiblemente 200-500% (es decir, dos a cinco veces superior respecto al control), más preferiblemente 1000-3000% superior.

"Muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia y secciones congeladas que se toman para propósito histológicos. Estas muestras incluyen fracciones de sangre y sangre o productos (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y

semejantes), esputo, tejido, células cultivadas, por ejemplo cultivos primarios, explantes y células transformada, heces, orina, etc. Una muestra biológica típicamente se obtiene de un organismo eucariótico, más preferiblemente un mamífero, tal como un primate por ejemplo, chimpancé o humano; vaca; perro; gato; roedor, por ejemplo, conejillo de indias, rata, ratón; conejo; o un ave; reptil; o un pez.

Una "biopsia" se refiere al proceso de retirar una muestra de tejido para evaluación de pronóstico o diagnóstico, y al propio espécimen de tejido. Cualquier técnica de biopsia conocida en la especialidad puede aplicarse a los métodos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido a evaluar (es decir, próstata, nodo linfático, hígado, medula ósea, célula de sangre), el tamaño y tipo del tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Técnica de biopsias representativas incluyen biopsia excisional, biopsia incisional, biopsia de agujas, biopsia quirúrgica y biopsia de medula ósea. Una "biopsia excisional" se refiere a eliminar toda una masa de tumor con un pequeño margen de tejido normal que le circunde. Una "biopsia incisional" se refiere a la eliminación de una cuña de tejido que incluye un diámetro en sección transversal del tumor. Un diagnóstico o pronóstico realizado por endoscopia o fluoroscopia puede requerir una "biopsia de aguja núcleo" de la masa de tumor, o una "biopsia de aspiración de aguja fina" que en general obtiene una suspensión de células del interior de la masa de tumor. Técnicas de biopsia se discuten, por ejemplo en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper, et al., eds., 16th ed., 2005, Capítulo 70, y hasta la Parte V.

Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad"

en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido o ácido nucleicos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácido o nucleótidos que son los mismos (es
5 decir, aproximadamente 60% de identidad, de preferencia 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o superior identidad sobre una región especificada, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) como se mide
10 utilizando algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros predefinidos descritos a continuación o por alineamiento manual e inspección visual (ver, por ejemplo, el sitio de la red NCBI: ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ o semejantes). Estas secuencias se dice que son
15 "substancialmente idénticas." Esta definición también se refiere a, o puede ser aplicada a el cumplimiento de una secuencia de prueba. La definición también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen substituciones. Como se describe a continuación, los
20 algoritmos preferidos pueden tomar en cuenta espacios y semejantes. De preferencia, existe identidad sobre una región que es al menos aproximadamente de 25 aminoácido o nucleótidos de longitud, o más preferible sobre una región que es 50-100 aminoácido o nucleótidos de longitud.

25 Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la cual se comparan secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, secuencias de prueba y referencia se suministran a una computadora, se designan coordenadas
30 subsecuentes, de ser necesario y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. De preferencia, los

parámetros de programa predefinidos pueden ser empleados, o pueden ser designados parámetros alternos. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces el por ciento de identidades de secuencia para las secuencias de prueba
5 respecto a la secuencia de referencia, con base en los parámetros de programa.

Una "ventana de comparación", como se emplea aquí, incluye referencia a un segmento de cualquiera de la cantidad de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste
10 de 20 a 600, usualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, en forma más usual aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se alinean en forma optima dos secuencias. Métodos de
15 alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la especialidad. Alineamiento optimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de
20 Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por la búsqueda para método de similaridad de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics
25 Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado
30 para determinar por ciento de identidad de secuencia y similaridad de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0,

que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se emplean, con los parámetros aquí descritos, para determinar por ciento de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. Programa o soporte lógico para realizar el análisis BLAST esta disponible al público a través del sitio de la red del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI = National Center for Biotechnology Information). Este algoritmo involucra primero identificar pares de secuencias de alta calificación (HSPs = high scoring sequence pairs), al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de interrogación, que cualquiera corresponden o satisfacen a una calificación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere como el umbral de calificación de palabra vecino (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas, para encontrar más largos HSPs que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones sobre cada secuencia hasta donde puede incrementarse la calificación de alineamiento acumulativo. Calificaciones acumulativas se calculan utilizando para secuencias nucleótido, los parámetros M (calificación de recompensa para un par de residuos concordantes; siempre > 0) y N (calificación de penalidad para residuos no concordantes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácido, una matriz de calificación se emplea para calcular la calificación acumulativa. La extensión de aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la calificación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X de su valor máximo logrado;

la calificación acumulativa pasa a cero o inferior debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo de calificación negativa; o el fin de cualquier secuencias se alcanza. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleótido) utiliza como valores predefinidos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa de (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias aminoácido, el programa BLASTP utiliza como valores predefinidos una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de calificación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

"Ácido nucleico" se refiere a deoxiribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en cualquiera forma de hebra sencilla o doble y sus complementos. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos nucleótido conocidos o residuos o articulaciones de estructura principal modificados, que son sintéticos, de origen natural, y no de origen natural, que tienen propiedades de enlace similares como el ácido nucleico de referencia y que se metabolizan en una forma similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de estos análogos incluyen sin limitación fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, quirál-metil fosfonatos, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido nucleicos (PNAs).

A menos que se indique de otra forma, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca en forma implícita sus variantes modificadas de manera conservadora (por ejemplo, substituciones codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada.

Específicamente, substituciones de codón generado pueden lograrse al generar secuencias en donde la tercer posición de uno o más codones selectos (o todos) se substituye con residuos de base mixta y/o deoxiinosina (Batzner et al.,
5 *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se forma de manera intercambiable con gen, cADN, mARN, oligonucleótido y polinucleótido.

10 Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca en forma implícita "variantes de combinación". Similarmente, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca en forma implícita cualquier proteína codificada por una variante de combinación de ese ácido
15 nucleico. "Variantes de combinación", como lo sugiere el nombre, son productos de combinación alterna de un gen. Después de transcripción, una transcripción de ácido nucleico inicial puede combinarse de manera tal que diferentes productos de combinación de ácido nucleico (alternos)
20 codifican diferentes polipéptidos. Mecanismos para la producción de variantes de combinación varían, pero incluyen combinación alterna de exones. Polipéptidos alternos derivados del mismo ácido nucleico por transcripción de lectura también son abarcados por esta definición. Cualesquiera
25 productos de una reacción de combinación, incluyendo formas recombinantes de los productos de combinación, se incluyen en esta definición. Un ejemplo de variantes de combinación de canal de potasio se discute en Leicher, et al., *J. Biol. Chem.* 273(52):35095-35101 (1998).

30 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se emplean en forma intercambiable aquí para referirse a un

polímero de residuos aminoácido. El término aplica a polímeros aminoácido en donde uno o más residuos aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido de origen natural y polímero de aminoácido que no es de origen natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácido de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan en una forma similar a los aminoácido de origen natural. Aminoácido de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácido que posteriormente son modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que se liga a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principal péptido modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos aminoácido se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan en una manera similar a un aminoácido de origen natural.

Aminoácido pueden ser referidos aquí ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission). Los nucleótidos, igualmente pueden

ser referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Variantes modificadas en forma conservadora" aplican tanto a secuencias de aminoácido como ácido nucleico.

5 Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas conservadoras se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácido idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido, a secuencias

10 esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. De esta manera, en toda posición en donde

15 se especifica una alanina por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas en forma

20 conservadora. Toda secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe toda variación silenciosa posible del ácido nucleico. Una persona con destreza reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que ordinariamente es el único codón para

25 metionina y TGG, que ordinariamente es el único codón para triptofano) puede ser modificado para dar por resultado una molécula funcionalmente idéntica. De acuerdo con esto, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido es implícita en cada secuencia descrita con

30 respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda actual.

Respecto a secuencias de aminoácido, una persona con destreza reconocerá que individuales sustituciones, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácido en la secuencia codificada es una "variante modificada en forma conservadora" en donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadora proporcionan aminoácido funcionalmente similares son bien conocidas en la especialidad. Estas variantes modificadas conservadoras son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos cada uno contienen aminoácido que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, e.g., Creighton, *Proteins* (1984)).

Una "etiqueta" o una "porción detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, etiquetas útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se emplea comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo por incorporación de una radioetiqueta en el péptido o emplearse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

El término "recombinante", cuando se emplea con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. De esta manera, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no-recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra forma se expresan anormalmente, sub-expresan o no se expresan por completo.

El término "heterólogo" cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce en forma recombinante, que tiene dos o más secuencias de genes no relacionados arreglados para ser un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo un promotor de una fuente y una región de codificación de otra fuente. Similarmente, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

La frase "condiciones severas de hibridización" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridizará a su subsecuencia objetivo o diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero a ninguna otra secuencia. Condiciones severas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridizan específicamente a superiores temperaturas. Una guía extensa a la hibridización de ácidos nucleicos se

encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, se eligen condiciones severas para que sean aproximadamente 5-10 grados C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una concentración ión pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo definida concentración iónica, pH, y concentración nucleica) en la cual 50% de las sondas complementarias a la diana u objetivo hibridizan a la secuencia objetivo al equilibrio (como las secuencias objetivo están presentes en exceso, a T_m , 50% de las sondas se ocupan en equilibrio). Condiciones severas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridización selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, de preferencia 10 veces hibridización de fondo. Condiciones de hibridización severa ejemplares pueden ser como sigue: 50% de formamida, 5x de SSC y SDS al 1%, incubación a 42 grados C o 5x de SSC, SDS al 1%, incubación a 65 grados, con lavado en 0.2x de SSC, y SDS al 0.1% a 65 grados C.

Ácidos nucleicos que no hibridizan entre sí bajo condiciones severas todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima degeneración de codón permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridizan bajo condiciones de hibridización moderadamente severas. "Condiciones de hibridización moderadamente severas" ejemplares incluyen una hibridización en un amortiguador de 40% de formamida, NaCl 1 M, SDS al 1% a

37 grados C, y un lavado en 1X de SSC a 45 grados C. Una hibridización positiva es al menos dos veces el fondo. Aquellos con destreza ordinaria fácilmente reconocerán que condiciones de hibridización y lavado alternativas pueden utilizarse para proporcionar condiciones de severidad similar. Guías adicionales para determinar parámetros de hibridización se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, et al., John Wiley & Sons.

Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36 grados C es típica para amplificación de baja severidad, aunque las temperaturas de hibridización pueden variar entre aproximadamente 32 grados C y 48 grados C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación PCR de alta severidad, una temperatura de aproximadamente 62 grados C es típica, aunque temperaturas de alineación de alta severidad pueden estar en el intervalo desde aproximadamente 50 grados C a aproximadamente 65 grados C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Condiciones de ciclo típicas tanto para amplificaciones de alta como baja severidad incluyen una fase de desnaturalización de 90 grados C - 95 grados C por 30 seg - 2 minutos, una fase de alineación que dura a 30 seg - 2 minutos, y una fase de extensión de aproximadamente 72 grados C por 1 - 2 minutos. Protocolos y guías para reacciones de amplificación de baja y alta severidad se proporcionan, por ejemplo en Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.).

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o su fragmento que liga específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de

región kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu constantes, así como la miriada de genes de región variable de inmunoglobulina. Cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda. Cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. En forma típica, la región de enlace de antígeno de un anticuerpo será más crítica en especificidad y afinidad de enlace.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipéptido, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácido primordialmente responsables por reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Existen anticuerpos, por ejemplo como inmunoglobulinas intactas o como una cantidad de fragmentos bien caracterizados por digestión con diversas peptidasas. De esta manera, por ejemplo, pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que el mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse bajo condiciones ligeras para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, de esta manera convirtiendo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' esencialmente es Fab con parte de la región bisagra (ver *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed. 1993). Mientras que

diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona con destreza apreciará que estos fragmentos pueden ser sintetizados de novo ya sea en forma química o al utilizar metodología de ADN recombinante. De esta manera, el término anticuerpo, como se emplea aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo ya sea producidos por la modificación de anticuerpos enteros, o aquellos sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de expresión en fago (ver, e.g., McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990))

Para preparación de anticuerpos convenientes de la invención y para uso de acuerdo con la invención, por ejemplo anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales, pueden emplearse en muchas técnicas conocidas en la especialidad (ver, por ejemplo Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); y Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de interés pueden clonarse de una célula, por ejemplo los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse de un hibridoma y utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Bibliotecas de genes que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales también pueden hacerse de hibridoma o células de plasma. Combinaciones al azar de los productos de genes de cadena pesada y ligera generan una gran reserva de anticuerpos con diferente

especificidad antigénica (ver, e.g., Kuby, *Immunology* (3rd ed. 1997)). Técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos recombinantes (patente de los E.U.A. No. 4,946,778, patente de los E.U.A. No. 4,816,567) pueden adaptarse para producir anticuerpos a polipéptidos de esta invención. También, ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, pueden emplearse para expresar anticuerpos humanizados o humanos (ver, por ejemplo, las patentes de los E.U.A. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)). En forma alterna, tecnología de expresión en fago puede emplearse para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que ligan específicamente a antígenos selectos (ver, e.g., McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). Anticuerpos también pueden hacerse biespecíficos, es decir capaces de reconocer dos antígenos diferentes (ver, e.g., WO 93/08829, Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo dos anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (ver, por ejemplo, patente de los E.U.A. No. 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

Métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no-humanos son bien conocidos en la especialidad. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácido introducidos en el de una fuente que no es humana. Estos

residuos aminoácido no humanos a menudo se refieren como
residuos de importación, que típicamente se toman de un
dominio variable de importación. La humanización puede
realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y
colaboradores (ver, e.g., Jones et al., *Nature* 321:522-525
5 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen
et al., *Science* 239:1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op.*
Struct. Biol. 2:593-596 (1992)), al sustituir CDRs de roedor o
secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un
10 anticuerpo humano. De acuerdo con esto, estos anticuerpos
humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de los E.U.A.
No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos que un dominio
variable humano intacto sea sustituido por la secuencia
correspondiente de una especie no humana. En la práctica,
15 anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en
donde algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR
se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos
de roedor.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de
20 anticuerpo en donde (a) la región constante, o una porción de
la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera tal que
el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza a
una región constante de una clase diferente o alterada,
función efectora y/o especie, o una molécula totalmente
25 diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo
quimérico, por ejemplo una enzima, toxina, hormona, factor de
crecimiento, droga, etc.; o (b) la región variable o una
porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con
una región variable que tiene una especificidad de antígeno
30 diferente o alterada. Los anticuerpos preferidos de, y para
utilizar de acuerdo con la invención, incluyen anticuerpos

monoclonales humanizados y/o quiméricos.

En una modalidad, el anticuerpo se conjuga a una porción "efectora". La porción efectora puede ser cualquier cantidad de moléculas, incluyendo porciones de etiquetado
5 tales como etiquetas radioactivas o etiquetas fluorescentes, o puede ser una porción terapéutica. En un aspecto, el anticuerpo modula la actividad de la proteína. Estas porciones efectoras incluyen, pero no están limitadas a, una droga anti-tumor, una toxina, un agente radioactivo, una
10 citoquina, un segundo anticuerpo o una enzima. Además, la invención proporciona una modalidad en donde el anticuerpo de la invención se enlaza a una enzima que convierte una prodroga en un agente citotóxico.

El inmunoconjugado puede ser utilizado para hacer
15 blanco a la porción efectora a una célula positiva de N-cadherina, particularmente células que expresan la N-cadherina o proteína Ly6. Estas diferencias pueden ser fácilmente aparentes cuando se ven las bandas de geles con muestras de control y prueba cargadas similarmente en forma aproximada.
20 Ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no están limitados a ricina, doxorubicina, daunorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina D, toxina difteria, Exotoxina pseudomonas
25 (PE) A, PE40, abrina y glucocorticoide y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. Marcadores detectables convenientes incluyen, pero no están limitados a, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminescente, compuesto quimioluminescente, un quemador de
30 metal o una enzima.

En algunas modalidades, la invención proporciona

anticuerpos a N-cadherina. Anticuerpos de N-cadherina pueden utilizarse en forma sistémica para tratar cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata o vejiga) solos o cuando se conjugan con una porción efectora. Anticuerpos de N-cadherina conjugados con agentes tóxicos, tales como ricina, así como anticuerpos no conjugados pueden ser agentes terapéuticos útiles naturalmente dirigidos a células de cáncer de próstata que contienen N-cadherina. Estos anticuerpos pueden ser útiles para bloquear la capacidad de invasión. Anticuerpos de N-cadherina convenientes para utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no están limitados a GC4, 1H7, 1F12 y 2B3.

Adicionalmente, la proteína recombinante de la invención comprende la región de enlace de antígeno de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención puede utilizarse para tratar cáncer. En esta situación, la región de enlace de antígeno de la proteína recombinante se une a cuando menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tiene actividad terapéutica. La segunda proteína puede incluir, pero no está limitada a una enzima, linfocina, oncostatina o toxina. Toxinas convenientes incluyen doxorubicina, daunorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina D, toxina difteria, Exotoxina pseudomonas (PE) A, PE40, ricina, abrina, glucocorticoide y radioisótopos.

Técnicas para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas (ver, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985);

Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal
5 Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)).

La frase "liga específicamente (o selectivamente)" a
10 un anticuerpo o "inmunoreactivo en forma específica (o selectiva) con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína, a menudo en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. De esta
15 manera, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados ligan a una proteína particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. Enlace específico a un anticuerpo bajo estas condiciones requiere un anticuerpo que se elige por su
20 especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, anticuerpos policlonales pueden seleccionarse para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunoreactivos con el antígeno selecto y no con otras proteínas. Esta selección puede lograrse al sustraer
25 anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con otras moléculas. Una variedad de formatos de inmunoensayo pueden emplearse para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, inmunoensayos ELISA de fase sólida se emplean rutinariamente
30 para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína (ver, e.g., Harlow & Lane, *Using Antibodies*,

A *Laboratory Manual* (1998) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden emplearse para determinar inmunoreactividad específica).

Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" aquí, se entiende una dosis que produce efectos para los cuales se administra. La dosis y formulación exactas dependerán del propósito del tratamiento, y serán evaluadas por una persona con destreza en la especialidad utilizando técnicas conocidas (ver, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edición, Gennaro, Editor (2003), y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

El término "sales farmacéuticas aceptables" o "portador farmacéutico aceptable" se entiende que incluya sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares que se encuentran en los compuestos aquí descritos. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición base al poner en contacto la forma neutra de estos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea neta o en un solvente inerte conveniente. Ejemplos de sales de adición base farmacéuticas aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición ácidas al poner en contacto la forma neutra de estos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea neto o en un solvente inerte conveniente. Ejemplos de

sales de adición de ácido farmacéuticas aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o de fósforo y semejantes, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, benzensulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metansulfónico y semejantes. También se incluyen sales de aminoácido tales como arginato y semejantes, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galactunórico y semejantes (ver, e.g., Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977)). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen tanto funcionalidades básicas como acídicas que permiten a los compuestos convertirlos ya sea en sales de adición base o ácido. Otros portadores farmacéuticos aceptables conocidos por aquellos con destreza en la técnica son adecuados para la presente invención.

Las formas neutras de los compuestos pueden ser regeneradas por contacto de la sal con una base o ácido y aislar el compuesto precursor en la forma convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes polares, pero de otra forma las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los propósitos de la presente invención.

Además de las formas sal, la presente invención proporciona compuestos que están en una forma de prodroga. Prodrogas de los compuestos aquí descritos son aquellos

compuestos que se someten fácilmente a cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, las prodrogas pueden convertirse a los compuestos de la presente invención por métodos químicos o bioquímicos en un ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, las prodrogas pueden convertirse lentamente a los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico conveniente.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretenden abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretenden dentro del alcance de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereoisómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales todos se pretenden abarcados dentro del alcance de la presente invención.

Transición Epitelial a Mesenquimal (EMT = Epithelial to Mesenchymal Transition) se refiere a la adquisición de características estromales por células de tumor epiteliales. En cáncer, EMT se asocia con un comportamiento invasivo y móvil y puede ser el proceso central subyacente a metástasis. EMT se asocia con pobre pronóstico y es mediado por factores de transcripción múltiples, tales como SNAIL, SLUG y TWIST.

E-Caderina, es una proteína de superficie celular que está involucrada en la adhesión célula-célula epitelial y es perdida comúnmente en tumores sólidos invasivos y metastásicos.

5

Modalidades Detalladas

La presente invención describe dos líneas celulares de hibridoma de ratón que producen anticuerpo monoclonal capaz de ligar al determinante antigénico de N-cadherina. Las líneas celulares de hibridoma de ratón se depositan como el
10 No. de Acceso ATCC PTA-9387 (1H7) y No. de Acceso ATCC PTA-9388 (EC4).

En una modalidad de la invención, se produce un anticuerpo por la línea celular de hibridoma designada como el No. de Acceso ATCC PTA-9387. En otra modalidad de la
15 invención, un anticuerpo se produce por la línea celular de hibridoma designada como el No. de Acceso ATCC PTA-9388.

Las células se depositaron como No. de Acceso ATCC PTA-9387 y No. de Acceso ATCC PTA-9388 de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección de Cultivo Tipo Americana
20 (ATCC = American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, en julio 23, 2008. Se probó y certificó la viabilidad en agosto 29, 2008.

En algunas modalidades de la invención, un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar al mismo determinante
25 antigénico de N-cadherina, *in vivo* o *in vitro*, que el anticuerpo monoclonal producidos por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9387 se produce. En algunas modalidades de la invención, un anticuerpo o su fragmento
30 capaz de ligar al mismo determinante antigénico de N-cadherina, *in vivo* o *in vitro*, que el anticuerpo monoclonal

producido por la línea celular de hibridoma depositado en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9388 se produce.

En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de
5 ligar al primer dominio extracelular de N-cadherina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de ligar al segundo dominio extracelular de N-cadherina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de ligar al tercer dominio extracelular de N-cadherina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de ligar al primer hasta el tercer dominio extracelular de N-cadherina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de ligar al cuarto dominio extracelular de N-cadherina.

La presente invención además se refiere a métodos
15 para inhibir el crecimiento o exterminio de células de cáncer en un paciente. Los métodos en general comprenden administrar el anticuerpo o fragmento de enlace del mismo de las reivindicaciones 5 u 11 a un paciente bajo condiciones suficientes para ligar el anticuerpo o fragmento de enlace del mismo a las células de tumor o células de tumor-cáncer de
20 próstata; modular actividad celular; inhibir angiogénesis de las células de tumor; y provocar inhibición de crecimiento o exterminio de las células de tumor, en donde las células de cáncer expresan o sobre-expresan N-cadherina.

En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al activar o inhibir transcripción y señalización NF kappa- β . En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al activar o inhibir internalización de N-cadherina.
25 En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al activar o inhibir ruta Akt o PI3 quinasa.
30

En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al activar o inhibir señalización de β -catenina. En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al bloquear heterodimerización de N-cadherina con FGFR u otro receptor de tirosina quinasa. En algunas otras modalidades de la invención, el anticuerpo modula actividad celular al bloquear o mejorar el rendimiento por ADAM10 u otra metalopeptidasa.

****** En algunas modalidades, el anticuerpo para inhibir el crecimiento o exterminio de células de cáncer urogenital en un paciente. En algunas modalidades, el anticuerpo para inhibir el crecimiento o exterminio de células de cáncer de próstata en un paciente. En algunas otras modalidades, el anticuerpo para inhibir el crecimiento o exterminio de células de cáncer de vejiga en un paciente.

Formulación y Administración

Los anticuerpos de anti-N-cadherina o immunoconjugados se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo como un bolo o por infusión continua sobre un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo se prefiere. La administración puede ser local o sistémica.

Las composiciones para administración comúnmente comprenderán un agente como se describe aquí (por ejemplo, inhibidores de N-cadherina, anticuerpos de N-cadherina e immunoconjugados, ARNip de N-cadherina y sus vectores) disueltos en un portador farmacéutico aceptable, de

preferencia un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos pueden emplearse, por ejemplo, salino amortiguado y semejantes. Estas soluciones son estériles y en general están libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticas aceptables como se requiere para aproximar condiciones fisiológicas tales como agentes de amortiguado y ajuste de pH, agentes para ajustar toxicidad y semejantes, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y semejantes. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se elegirá primordialmente con base en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y semejantes, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente.

De esta manera, una composición farmacéutica típica para administración intravenosa variará de acuerdo con el agente. Métodos actuales para preparar composiciones de administración parenteral serán conocidos o aparentes para aquellos con destreza en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en una variedad de formas de dosis unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, formas de dosis unitarias adecuadas para administración oral incluyen pero no están limitadas a polvos, tabletas, píldoras, cápsulas y pastillas. Se reconoce que los anticuerpos cuando se

administran oralmente, deberán ser protegidos de la digestión. Esto es típicamente logrado ya sea al complejar las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a hidrólisis
5 ácida y enzimática, o al empacar las moléculas en un portador resistente apropiado, tal como una barrera de protección o liposoma. Medios de agentes de protección de digestión son bien conocidos en la técnica.

Formulaciones farmacéuticas, particularmente, de los anticuerpos e inmunoconjugados e inhibidores para utilizar con
10 la presente invención, pueden prepararse al mezclar un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticos aceptables. Estas formulaciones pueden ser formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o
15 estabilizantes aceptables, no son tóxicos a los recipientes a las dosis y concentraciones empleadas. Portadores, excipientes o estabilizantes aceptables, pueden ser acetato, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), conservadores, polipéptidos de
20 bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero o gelatina, o polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; y aminoácidos, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes; y surfactantes iónicos y no
25 iónicos (por ejemplo, polisorbato); contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo complejos de proteína-Zn); y/o surfactantes no iónicos. El anticuerpo puede formularse a una concentración de entre 0.5 - 200 mg/ml, o entre 10-50 mg/ml.

30 La formulación también puede proporcionar compuestos activos adicionales, incluyendo agentes quimioterapéuticos,

agentes citotóxicos, citoquinas, agente inhibidor de crecimiento y agente anti-hormonal. Los ingredientes activos también pueden elaborarse como preparaciones de liberación sostenida (por ejemplo, matrices semi-permeables de polímeros hidrofóbicos sólidos (por ejemplo, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli (vinilalcohol)), polilactidas. Los anticuerpos e inmunoconjugados también puede atraparse en micro cápsulas preparadas, por ejemplo técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o micro cápsulas de gelatina y micro cápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente en sistemas de suministro de droga coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las composiciones pueden ser administradas para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en una "dosis terapéutica efectiva". Cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general de salud del paciente. Administraciones sencillas o múltiples de las composiciones pueden suministrarse dependiendo de las dosis y frecuencias según se requiera y tolere por el paciente. Un "paciente" o "sujeto" para los propósitos de la presente invención, incluye tanto a humanos como otros animales, particularmente mamíferos. De esta manera los métodos son aplicables tanto para aplicaciones de terapia en humanos como en veterinaria. En la modalidad preferida, el paciente es un mamífero, de preferencia un primate, y en la modalidad más preferida, el paciente es humano. Otras

terapias de cáncer conocidos pueden emplearse en combinación con los métodos de la invención. Por ejemplo, las composiciones para utilizar de acuerdo con la invención también pueden emplearse para hacer blanco o sensibilizar una
5 célula a otros agentes terapéuticos de cáncer tales como 5FU, vinblastina, actinomicina D, cisplatina, metotrexato y semejantes.

En otras modalidades, los métodos de la invención con otras terapias de cáncer (por ejemplo, prostatectomía
10 radical), terapia de radiación (haz externo o braquiterapia), terapia hormonal (por ejemplo, orquiectomía, terapia análoga de LHRH para suprimir producción de testosterona, terapia anti-andrógeno) o quimioterapia. Prostatectomía radical involucra la eliminación de toda la glándula de la próstata
15 más algo de tejido circundante. Este tratamiento se emplea comúnmente cuando el cáncer se considera que no se ha diseminado más allá del tejido. La terapia de radiación comúnmente se emplea para tratar cáncer de próstata que todavía está confinado a la glándula próstata, o se ha
20 dispersado a tejido cercano. Si la enfermedad es más avanzada, puede emplearse radiación para reducir el tamaño del tumor. La terapia de hormonas a menudo se emplea para pacientes cuyo cáncer de próstata se ha diseminado más allá de la próstata o ha recurrido. El objetivo de la terapia de hormonas es
25 reducir niveles de las hormonas masculinas, andrógenos y de esta manera provocar que el cáncer de próstata se encoja o crezca más lentamente. Agonistas de hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH = Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) disminuyen la producción de testosterona. Estos
30 agentes pueden ser inyectados ya sea en forma mensual o por más tiempo. Dos de estos análogos son leuprolida y

goserelina. Anti-andrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida y nilutamida) también pueden emplearse. Bloqueo de andrógeno total se refiere al uso de anti-andrógenos en combinación con orquiectomía o análogos LHRH, la combinación S se denomina. Quimioterapia es una opción para pacientes cuyo 5 cáncer de próstata se ha dispersado fuera de la glándula próstata y para quienes ha fallado la terapia hormonal. No se espera destruir todas las células de cáncer, pero se puede frenar el crecimiento de tumor y reducir el dolor. Algunas de 10 las drogas o fármacos de quimioterapia empleados para tratar cáncer de próstata que ha regresado o continuado creciendo y diseminando después de tratamiento con terapia hormonal incluyen doxorubicina (Adriamicina), estramustina, etopósido, mitoxantrona, vinblastina y paclitaxel. Dos o más fármacos a 15 menudo se suministran juntos para reducir la probabilidad de que las células de cáncer se vuelvan resistentes a la quimioterapia. Carcinoma de células pequeñas es un tipo raro de cáncer de próstata que es más probable que responda a quimioterapia que a terapia hormonal.

20 En algunas modalidades, un "cardioprotector" también se administra con el anticuerpo de N-cadherina, inhibidor de enlace N-cadherina o molécula ARNip de N-cadherina para utilizar de acuerdo con la invención (ver, la patentes de los E.U.A. Número 6,949,245). Un cardioprotector es un compuesto 25 o composición que evita o reduce la disfunción del miocardio (es decir cardiomiopatía y/o falla cardíaca congestiva) asociada con la administración a un paciente de un fármaco, tal como un antibiótico de antraciclina. El cardioprotector por ejemplo puede bloquear o reducir un efecto cardiotóxico 30 mediado por radicales libres y/o evitar o reducir lesión de esfuerzo oxidativo. Ejemplos de cardioprotectores abarcados

por la presente definición incluyen el agente quelante de hierro dexrazoxano (ICRF-187) (Seifert et al. The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072 (1994)); un agente de reducción de lípidos y/o anti-oxidantes tal como (Singal et al. J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063 (1995)); amifostina (aminotiol 2-
 5 [(3-aminopropil)amino]etantiol-dihidrógeno fosfato éster, también denominado WR-2721, y su forma de absorción celular desfosforilada denominada WR-1065) y ácido S-3-(3-metilaminopropilamino)propilfosforo-tioico (WR-151327), ver
 10 Green et al. Cancer Research 54:738-741 (1994); digoxina (Bristow, M. R. In: Bristow M R, ed. Drug-Induced Heart Disease. New York: Elsevier 191-215 (1980)); beta-bloqueadores tal como metoprolol (Hjalmarson et al. Drugs 47:Suppl 4:31-9 (1994); y Shaddy et al. Am. Heart J. 129:197-9 (1995));
 15 vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); depuradores de radicales libres tales como ácido oleanólico, ácido ursólico y N-acetilcisteína (NAC); compuestos de atropamiento de espín tales como alfa-fenil-ter-butil nitrona (PBN); (Paracchini et al., Anticancer Res. 13:1607-1612 (1993)); compuestos
 20 selenoorgánicos tales como P251 (Elbesen); y semejantes.

Las administraciones combinadas contemplan co-administración, utilizando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde de preferencia hay un periodo de
 25 tiempo mientras que ambos (o todos) de los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Moléculas y compuestos identificados que modulan en forma directa o indirecta la expresión y/o función de una proteína N-cadherina, pueden ser útiles para tratar cánceres
 30 que respectivamente, expresan N-cadherina. Moduladores de proteína N-cadherina pueden administrarse solos o co-

administrarse en combinación con convencionales quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, así como los agentes terapéuticos actualmente desarrollados.

Formulaciones adecuadas para administración oral
5 pueden consistir de (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva de ácido nucleico empacado suspendido en diluyentes, tales como agua, salino o PEG 400; (b) cápsulas, saquitos o tabletas, cada uno que contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como líquidos, sólidos,
10 gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones convenientes. Formas de tabletas pueden incluir uno o más de lactosa, sucrosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco,
15 estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, rellenos, aglutinantes, diluyentes, agentes amortiguadores, agentes humectantes, conservadores, agentes saborizantes, colorantes, agentes de desintegración y portadores farmacéuticos compatibles. Formas de pastillas
20 pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, por ejemplo sacarosa, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de acacia, geles y semejantes que contienen, además del ingrediente activo,
25 portadores conocidos en la especialidad.

El compuesto de selección, solo o en combinación con otros componentes convenientes, puede elaborarse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden ser "nebulizados") para administrarse por inhalación. Formulaciones en aerosol
30 pueden colocarse en propulsores aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y semejantes.

Formulaciones convenientes para administración rectal incluyen, por ejemplo supositorios, que consisten del ácido nucleico empacado con una base de supositorio. Bases de supositorio convenientes incluyen triglicéridos naturales o
5 sintéticos o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible utilizar cápsulas rectales de gelatina que consisten de una combinación del compuesto de selección con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilen glicol e hidrocarburos de parafina.

10 Formulaciones adecuadas para administración parenteral, tal como por ejemplo, por rutas intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumor, intradérmica, intraperitoneal, y subcutáneas, incluyen
15 soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del recipiente pretendido y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir
20 agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservadores. En la práctica de esta invención, composiciones pueden administrarse, por ejemplo por infusión intravenosa, en forma oral, tópica, intraperitoneal, intravertical o intratecal. Administración parenteral, administración oral y administración intravenosa son los
25 métodos preferidos de administración. Las formulaciones de los compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de múltiples dosis, tales como ampollas y ampollétas.

Soluciones y suspensiones para inyección pueden
30 prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo previamente descrito. Células transducidas por

ácidos nucleicos para terapia ex vivo, también pueden administrarse en forma intravenosa o parenteral, como se describió anteriormente.

La preparación farmacéutica de preferencia está en forma de dosis unitaria. En esta forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación empacada, el empaque contiene cantidades discretas de preparación, tales como tabletas empacadas, cápsulas y polvos en ampolletas o ampollas. También, la forma de dosis unitaria puede ser una cápsula, tableta, oblea o pastilla misma, o puede ser el número apropiado de cualesquiera de estas en forma empacada. La composición puede, si se desea, también contener otros agentes terapéuticos compatibles.

Preparaciones farmacéuticas preferidas suministran uno o más moduladores de proteína N-cadherina activos, opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inmuno terapéuticos, en una formulación de liberación sostenida. Típicamente, el modulador N-cadherina se administra en forma terapéutica como un agente de sensibilización que aumenta la susceptibilidad de las células de tumor a otras terapias de cáncer citotóxicas, incluyendo quimioterapia, terapia de radiación, inmunoterapia y terapia hormonal.

En uso terapéutico para el tratamiento de cáncer, los moduladores o inhibidores de N-cadherina utilizados en el método farmacéutico de la invención, se administran en la dosis inicial de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, diariamente. Pueden emplearse un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente

500 mg/kg, o aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Las dosis, sin embargo, pueden variarse dependiendo de los requerimientos del paciente, la severidad de la condición que se trata, y el compuesto que se emplea. Por ejemplo, dosis pueden determinarse empíricamente considerando el tipo y etapa de cáncer diagnosticado en un paciente particular. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, deberá ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica benéfica en el paciente, con el tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un vector particular, o tipo de célula transducida en un paciente particular. La determinación de la dosis propia para una situación particular está dentro de la destreza del practicante. En general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son menos que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosis se aumenta por pequeños incrementos hasta que alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosis diaria total puede ser dividida y administrada en porciones durante el día, si se desea.

Las preparaciones farmacéuticas (por ejemplo, ARNips de N-cadherina, anticuerpos de N-cadherina, vacunas de N-cadherina, inhibidores de N-cadherina e immunoconjugados) para utilizar de acuerdo con la invención, típicamente se suministran a un mamífero, incluyendo humanos y mamíferos no humanos. Mamíferos no humanos tratados utilizando los presentes métodos incluyen animales domesticados (*es decir*, caninos, felinos, murinos, roedores y lagomorfos) y animales

agrícolas (bovino, equino, ovino, porcino).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Ensayo NF kappa β reportero con TAL como control negativo.

Como se muestra en las Figuras 2-3, la actividad NF kappa β reportero se aumenta en células que expresan N-cadherina estable. Esto es cierto tanto en medios repletos como agotados de andrógeno. También se muestra que la activación NF kappa β se correlaciona con la cantidad de expresión N-cadherina, ya que LNCaP-C1 expresa más N-cadherina que C2 y C3.

Ejemplo 2

Como se muestra en la Figuras 4-5, N-cadherina se expresa en la superficie celular de células LNCaP-C1, y que estas células tienen tanto superiores cantidades de expresión de NF kappa β , pero que NF kappa β se activa, como se muestra por la fuerte señal celular en células C1. Células de control también expresan NF kappa β , pero se localizan primordialmente en el citoplasma.

Ejemplo 3

Las Figuras 6-7 muestran que la activación NF kappa β por N-cadherina que muestra regulación por incremento de los genes objetivo NF kappa β TGF β , IL-6, IL-8, y bcl-2.

Ejemplo 4

Como se muestra en la FIGURA 8, la interferencia génica de N-cadherina provoca reducción en expresión de gen objetivo NF kappa β , tal como IL-6 y IL-8, de nuevo mostrando que N-cadherina regula NF kappa β .

Ejemplo 5

La FIGURA 9 muestra la actividad de promotor NF kappa β antes y después de tratamiento con anticuerpos dirigidos a N-cadherina. Los datos muestran que hay regulación a la alta inmediata de NF kappa β mediada por estos anticuerpos, seguido a 7 días por regulación a la baja o por disminución. Estos datos muestran que los anticuerpos pueden funcionar en parte alterando la transducción de señal corriente abajo NF kappa β .

Ejemplo 6

La FIGURA 10 muestra la tinción de N-cadherina con y sin tratamiento con anticuerpos dirigidos de N-cadherina. En células tratadas con control, la mayoría de N-cadherina se ve en forma intracelular; mientras que en la presencia de un anticuerpo, la expresión de N-cadherina se estabiliza en la superficie celular. Estos datos sugieren que la estabilización de N-cadherina en la superficie celular es otro mecanismo de acción de anticuerpos de N-cadherina. Esto probablemente resulta en alteraciones en señalización de beta-catenina, que están mediadas a través de rompimiento y internalización de N-cadherina por metalopeptidasas tales como ADAM 10, entre otros.

Ejemplo 7

Como se muestra en la FIGURA 11, la regulación a la baja de N-cadherina puede provocar reducciones en la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt.

Ejemplo 8

Como se muestra en la FIGURA 12, el tratamiento de células con anticuerpos dirigidos de N-cadherina provoca alteraciones (tanto hacia arriba como hacia abajo) de fosforilación Akt o activación, que soporta la noción de que estos anticuerpos funcionan, total o parcialmente, alterando

la transducción de señal PI3K-Akt.

Ejemplo 9: Análisis FACS que muestra criba de clones de anticuerpos que hacen blanco al primer dominio extracelular de la proteína N-cadherina.

5 La FIGURA 13 muestra reconocimiento de la proteína en la superficie de células de cáncer de próstata.

Ejemplo 10: Análisis FACS que muestra criba de clones de anticuerpos que hacen blanco al cuarto dominio extracelular de la proteína N-cadherina.

10 La FIGURA 14 muestra que clones reconocen N-cadherina en la superficie de células de cáncer de próstata.

Ejemplo 11: Subclonación de anticuerpos de N-cadherina.

15 La FIGURA 15 muestra que clones monoclonales purificados reconocen la proteína en la superficie celular.

Ejemplo 12: Ensayo de invasión In vitro.

20 La FIGURA 16 muestra que los anticuerpos monoclonales 1F12, 1H7 y 2B3 generados por el grupo de los inventores, todos inhiben la invasividad de células de cáncer positivas de N-cadherina. GC4 es un control.

Ejemplo 13: Anticuerpos contra N-cadherina bloquean crecimiento de tumor y metástasis de células de cáncer de próstata PC3, pero no tienen efecto en tumores nulos N-cadherina.

25 Células PC3 se implantaron subcutáneamente y desarrollaron. Como se muestra en la FIGURA 17b, cuando los tumores alcanzan la etapa palpable al día 15, anticuerpos o control se dieron dos veces por semana (200 microgramos) por dos semanas. Tanto 1H7 como EC4 fueron capaces de permitir
30 crecimiento de tumores. También bloquearon completamente metástasis. Ratones de control 5/5 tuvieron metástasis de

5 nodos linfáticos, en comparación con 0/5 y 0/5 ratones
tratados 1H7 y EC4, respectivamente. En contraste, los
anticuerpos 1H7 y EC4 no tuvieron efecto en el crecimiento de
tumores nulos de N-cadherina (FIGURA 17a). Las Figuras 17c y
17d muestran claros efectos inhibitorios de anticuerpos de N-
cadherina en el crecimiento de tumores PC3, ya sea en
tratamiento de tumores grandes establecidos (tratamiento que
parte el Día 21) o en tratamiento a largo plazo (tratamiento
que dura tanto como 62 días).

10 **Ejemplo 14: Tumores de experimento in vivo muestran
efectos de anticuerpos contra N-cadherina.**

15 Como se muestra en la FIGURA 18, los dos tumores de
control son muy rojos consistentes con angiogénesis profunda.
También son profundamente adherentes con e invasivos en la
musculatura de flanco local. En contraste, los ratones
tratados con 1H7 y EC4 tuvieron tumores pálidos, claros, que
no invaden el músculo local. Los tumores se desprenden
fácilmente de los tejidos subyacentes, lo que demuestra
inhibición de angiogénesis y bloqueo de invasión local por los
anticuerpos anti-N-cadherina, consistente con el hallazgo de
que estos ratones no tuvieron enfermedad metastática.

20 **Ejemplo 15: Tinción Inmunohistoquímica**

25 Los inventores han llevado a cabo tinción
inmunohistoquímica de un cáncer de próstata LAPC 9
independiente de andrógeno. El resultado muestra que N-
cadherina solo se expresa por un pequeño subconjunto de
células (FIGURA 19a).

30 **Ejemplo 16: Crecimiento de Tumor LAPC-9 dependiente
e independiente de Andrógeno**

Para determinar si N-cadherina puede ser un blanco
para tratamiento y diagnóstico aún cuando N-cadherina no se

sobre expresa en las células o solo se expresa en un subconjunto de células, los inventores han estudiado el crecimiento de tumor de tumores LAPC-9 dependientes e independientes de andrógeno. Los tumores LAPC-9 dependientes e independientes de andrógeno se trataron con PBS de control o anticuerpos de N-cadherina 1H7 y EC4, respectivamente. Los resultados muestran que aún cuando N-cadherina se expresa solo en un pequeño subconjunto de las células independientes de andrógeno, ése tratamiento con anticuerpo es suficiente para retrasar el crecimiento y avance de los tumores independientes de andrógeno (FIGURA 20). Estos resultados sugieren que la población de N-cadherina de células se requiere para formación de tumor independiente de andrógeno, y que el bloqueo es suficiente para retrasar el avance de tumor. Estos resultados son consistentes con una interpretación de que N-cadherina marca una población de células madre independientes de andrógeno. El bloqueo de crecimiento de las células madre es suficiente para bloqueo del crecimiento de tumor. Estos resultados también muestran que anticuerpos pueden funcionar en células que expresan niveles normales o incluso bajos de N-cadherina.

Ejemplo 17: Crecimiento de células de tumor positivo y negativo de N-cadherina clasificado y no clasificado

A fin de determinar los efectos de células de N-cadherina positiva en crecimiento de células de tumor, células positivas y negativas de N-cadherina se clasificaron dando por resultado una población de células que fueron 100% y 0% positivas para N-cadherina, respectivamente. Las células después se inyectaron en ratones castrados, y las células positivas de N-cadherina formaron tumores más rápidamente y en forma eficiente que la población negativa (FIGURA 20),

sugiriendo que las células positivas de N-cadherina ya tienen una ventaja de crecimiento, o que tienen características de células madre y son más tumorigénicas que la población negativa. Las células no clasificadas crecen en forma similar a las células positivas de N-cadherina.

Ejemplo 18: Análisis FACS de tumores a partir de células clasificadas de N-cadherina

Análisis FACS de tumores que se desarrollan a partir de células positivas y negativas de N-cadherina puramente, contra la población no clasificada de control. Tumores de células positivas N-cad al 100% son solo 41.25% positivos para N-cadherina (Figuras 21 y 22), sugiriendo que estas células dan lugar a células nulas de N-cadherina. Esto es consistente con la hipótesis de que células positivas de N-cadherina, son células madre que pueden dar lugar a más células negativas de N-cadherina más diferenciadas. Mientras tanto, la población negativa de N-cadherina da lugar a tumores que son 9% positivos de N-cadherina (Figuras 21 y 22), similar a las células no clasificadas (Figuras 21 y 22). Esto sugiere que el crecimiento de estas células requiere que una población tipo madre adquiera o N-cadherina regulada a la alta, a fin de formar tumores independientes de andrógeno. El retraso en tumorigenicidad se provoca por el requerimiento de N-cadherina para dar lugar a tumores independientes de andrógeno.

Ejemplo 19: Crecimiento de tumores LNCaP-C1 establecidos se inhibe por anticuerpos de N-Cadherina.

Como se muestra en la FIGURA 23, anticuerpos de N-Cadherina 1H7 y EC4 se administraron a ratones que contienen tumores LNCaP-C1 del Día 45 al Día 56, y sus efectos inhibitorios en crecimiento de tumor fueron aparentes al Día 72.

Ejemplo 20: Anticuerpos de N-Cadherina inhiben crecimiento de tumores independientes de andrógeno LAPC-9.

Como se muestra en la FIGURA 24a, anticuerpos de N-cadherina 1H7 y EC4 se administraron a ratones que contienen tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos (pasaje 7) a 10 mg/kg dos veces a la semana a partir del Día 15. El efecto inhibitorio es aparente el Día 30. Los efectos inhibitorios de 1H7 y EC4 en tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos grandes, se muestran en la FIGURA 24b, en donde los animales no recibieron tratamiento de anticuerpo hasta el Día 17.

Ejemplo 21: Inhibición de crecimiento dependiente de dosis por anticuerpo EC4

Como se muestra en la Figura 25, el crecimiento de tumores PC3 en ratones desnudos, se inhibió por el anticuerpo EC4 (administrado a partir del Día 13 al Día 27), con un efecto inhibitorio más prominente que se observa en experimentos en donde una dosis superior del anticuerpo se administró.

Ejemplo 22: Estudio de toxicidad

Debido a que N-Cadherina se expresa ampliamente en una variedad de tejidos, su toxicidad potencial es una consideración si se van a utilizar anticuerpos de anti-N-Cadherina como agentes terapéuticos. Los presentes inventores han encontrado que los anticuerpos 1H7 y EC4 reacciona en forma cruzada con N-Cadherina murina, pero no se ha observado toxicidad *in vivo* en cualquiera de los estudios de escala de dosis o a largo plazo en ratones.

Ejemplo 23: Anticuerpos de N-Cadherina inhiben avance independiente de andrógeno de tumores dependientes de andrógeno LAPC-9.

Como se muestra en las Figuras 26a y 26b, anticuerpos de N-Cadherina 1H7 y EC4, efectivamente inhiben el avance independiente de andrógeno de tumores dependientes de andrógeno LAPC-9 en ratones castrados. En el primer estudio (Figura 26a), los anticuerpos se administraron del Día 0 al Día 31 y los animales se observaron por 45 días. En el segundo estudio (Figura 26b), se observó el efecto del tratamiento de anticuerpos a largo plazo. 1H7 mostró retraso moderado en avance de tumor, mientras que EC4 mostró un efecto más prolongado para bloquear avance de tumor.

Ejemplo 24: Células positivas de N-Cadherina tienen ventaja de crecimiento en ratones castrados.

Como se muestra en la Figura 27, tumores LAPC-9 positivos de N-Cadherina mostraron ventaja de crecimiento sobre tumores LAPC-9 negativos de N-Cadherina en ratones SCID castrados. Por otra parte, la Figura 28 ilustra la correlación inversa entre el nivel de expresión de N-Cadherina y expresión de receptor de andrógeno en células independientes de andrógeno LAPC-9: junto con pasajes sucesivos, las células LAPC-9 ganaron progresivamente independencia de andrógeno mientras que su expresión de N-Cadherina aumentó y su expresión de receptor de andrógeno disminuyó.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y otras publicaciones, incluyendo los Números de Acceso GenBank, citadas en esta solicitud, se incorporan por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9387.

2. Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de la reivindicación 1.

3. Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9388.

4. Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 4.

5. Un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar a dominios 1-3 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, in vivo o in vitro, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9387.

6. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado o totalmente humano.

7. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el anticuerpo es un diacuerpo o scFv.

8. Un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar al dominio 4 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, in vivo o in vitro, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9388.

9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado o totalmente humano.

10. El anticuerpo de conformidad con la

reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo es un diacuerpo o scFv.

11. Un método para inhibir el crecimiento de células de cáncer en un paciente, el método se caracteriza porque comprende la etapa de: administrar un anticuerpo o su fragmento de la reivindicación 5 u 8 a un paciente, bajo condiciones suficientes para ligar el anticuerpo o su fragmento a las células de cáncer, en donde las células de cáncer expresan o sobre-expresan N-cadherina, y en donde el anticuerpo inhibe el crecimiento de células de cáncer por (a) activar o inhibir señalización y transcripción de NF kappa- β ; (b) activar o inhibir internalización de N-cadherina; (c) activar o inhibir quinasa o la ruta Akt o PI3; (d) activar o inhibir la señalización de β -catenina; (e) bloquear heterodimerización de N-cadherina con FGFR u otro receptor de tirosina quinasa; o (f) bloquear o mejorar el rompimiento por ADAM10 u otra metalopeptidasa.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque las células de cáncer son células de cáncer urogenitales.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque las células de cáncer son células de cáncer de próstata.

14. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque las células de cáncer son células de cáncer de vejiga.

15. Un método para tratar a un paciente de cáncer, caracterizado porque comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba, de un individuo con riesgo de tener cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia o cantidad de la proteína

N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo que se conoce negativo para cáncer; de esta manera diagnosticando el cáncer que expresa una proteína de N-cadherina, en donde la
5 proteína de N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un sub-conjunto de células o es sobre-expresada; y (c) administrar una cantidad efectiva de anticuerpo N-cadherina o fragmento de la reivindicación 5 u 8 al individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una
10 proteína de N-cadherina.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga.

17. El método de conformidad con la reivindicación
15 15, caracterizado porque el cáncer es un cáncer de próstata.

18. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el cáncer es un cáncer de vejiga.

19. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo bloquea cáncer de
20 próstata refractario a hormona.

20. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo bloquea células madre de cáncer.

21. El método de conformidad con la reivindicación
25 15, caracterizado porque la muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga.

22. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el cáncer es un cáncer metastásico.

23. El método de conformidad con la reivindicación
30 15, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

24. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo es un scFv.

25. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo es un diacuerpo.

5 26. Un método de diagnóstico de un paciente con cáncer, caracterizado porque comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba para un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia o cantidad
10 de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba, en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo que se conoce es negativo para el cáncer, al contactar una muestra con una cantidad efectiva de un anticuerpo de N-cadherina o fragmento de la reivindicación 5 u
15 8; de esta manera diagnosticando el cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un sub-conjunto de células, o se sobre-expresa.

20 27. Un método para identificar células madre de cáncer, caracterizado porque comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de tejido de prueba de un individuo con riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra de tejido de prueba, en
25 comparación con una muestra de tejido de control de un individuo que se conoce es negativo para el cáncer; en donde la proteína N-cadherina se expresa a niveles normales o bajos, o se expresa por un sub-conjunto de células madre y no se sobre-expresa, utilizando los anticuerpos de las
30 reivindicaciones 5 u 8.

28. El método de conformidad con la reivindicación

27, caracterizado porque la muestra de tejido es un tejido de próstata o de vejiga.

29. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el cáncer es un cáncer de próstata.

5 30. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el cáncer es un cáncer de vejiga.

31. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el cáncer es un cáncer de próstata refractario a hormona.

10 32. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el cáncer es un cáncer metastásico.

33. Un método para identificar un anticuerpo de anti-N-cadherina o un compuesto que inhibe el crecimiento de células de cáncer en un paciente, el método se caracteriza
15 porque comprende las etapas de (i) contactar el compuesto o anticuerpo con una célula que expresa o sobre-expresa un polipéptido de N-cadherina; y (ii) determinar el efecto funcional del compuesto o anticuerpo sobre el polipéptido de N-cadherina al determinar si el compuesto o anticuerpo: (a)
20 activa o inhibe señalización y transcripción de NF kappa- β ; (b) activa o inhibe internalización de N-cadherina; (c) activa o inhibe la ruta Akt o PI3 quinasa; (d) activa o inhibe señalización de β -catenina; (e) bloquea heterodimerización de N-cadherina con EGFR u otro receptor de tirosina quinasa; o
25 (f) bloquea o mejora la ruptura por ADAM10 u otra metalopeptidasa.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos a los dominios primero-tercero de N-cadherina y el cuarto dominio de N-cadherina, para diagnóstico y terapia de cánceres relacionados con N-cadherina. También se describen métodos de diagnóstico y tratamiento que utilizan éstos anticuerpos.

10

15

20

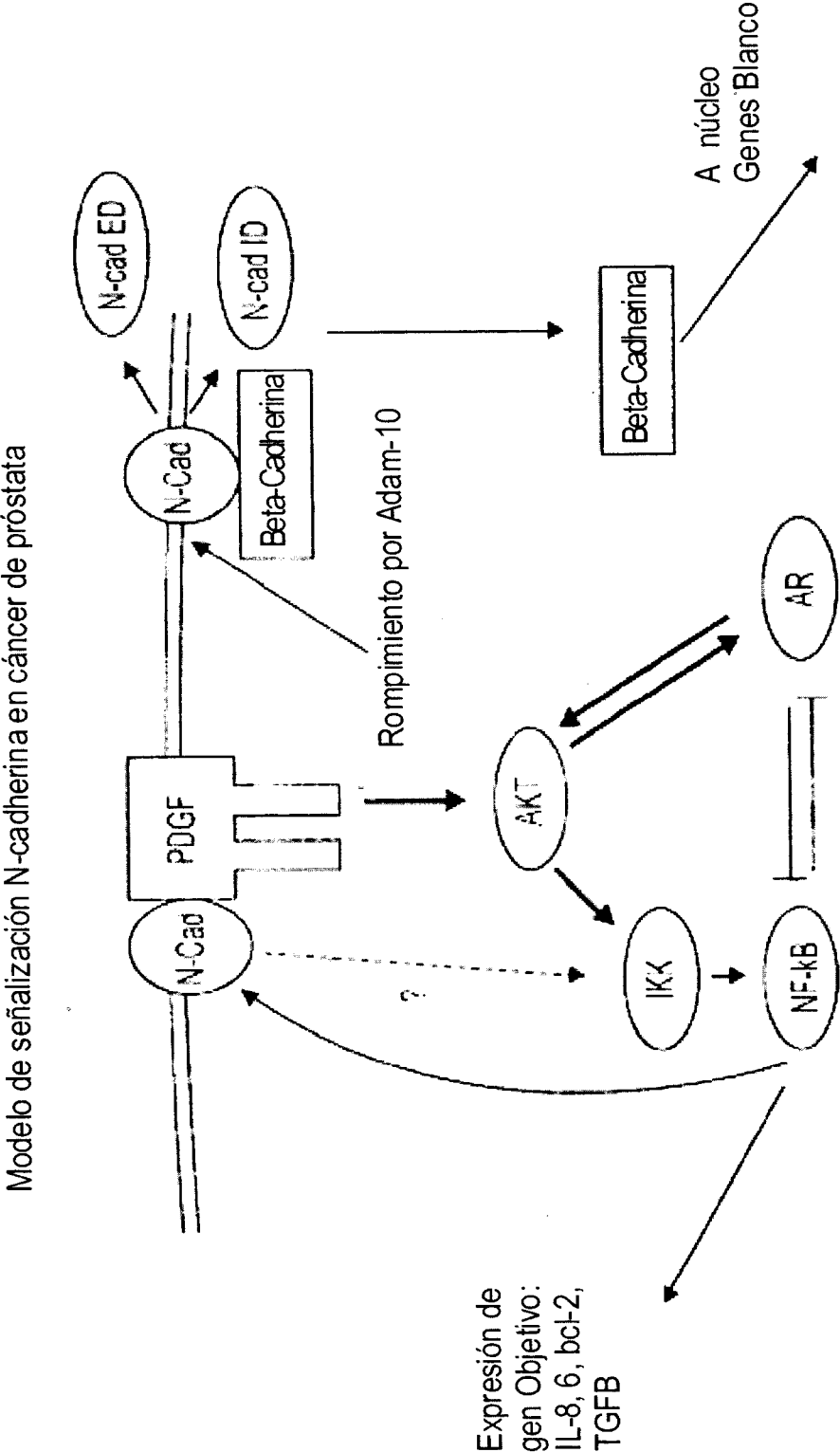
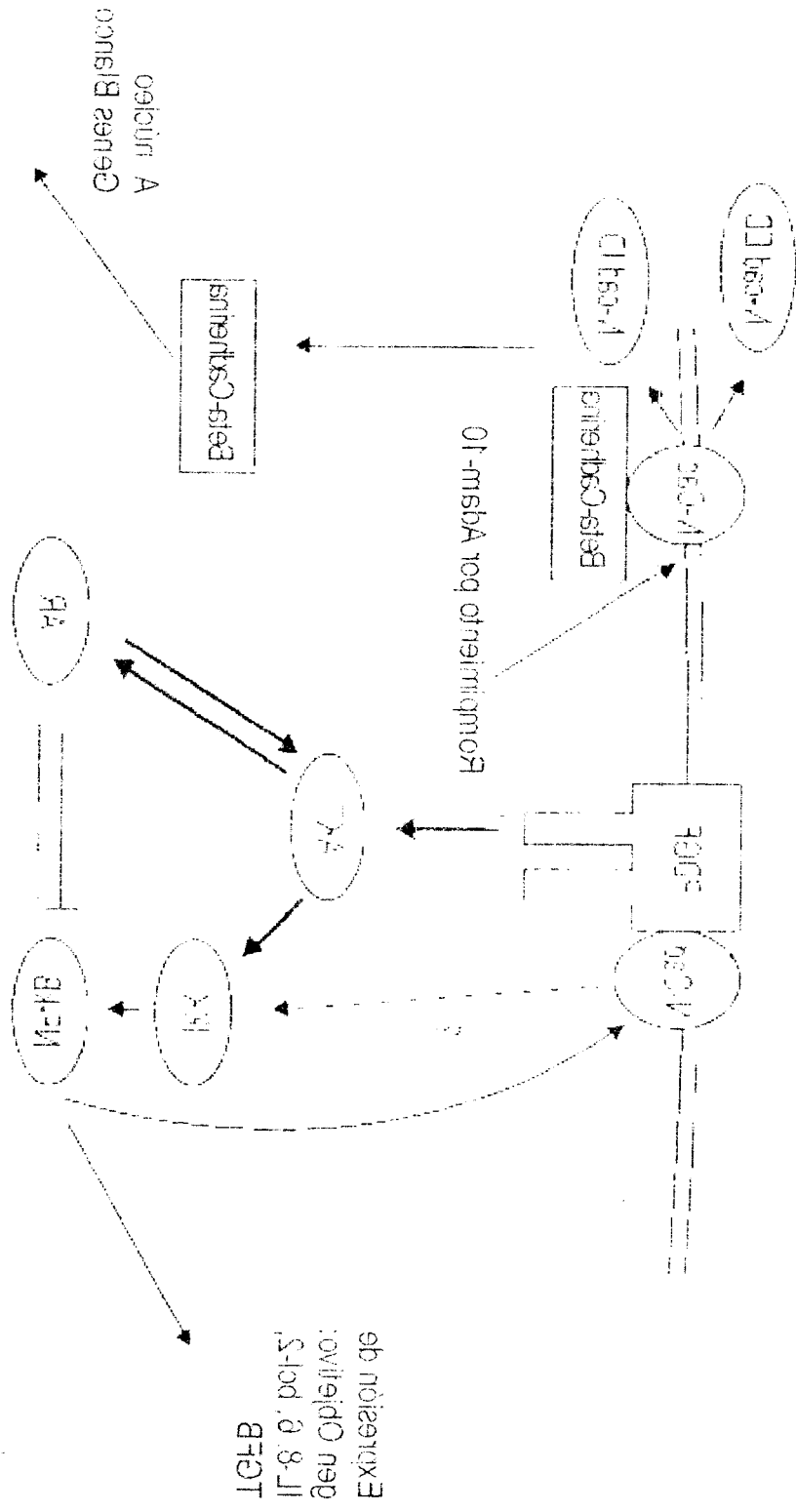


FIG. 1



701

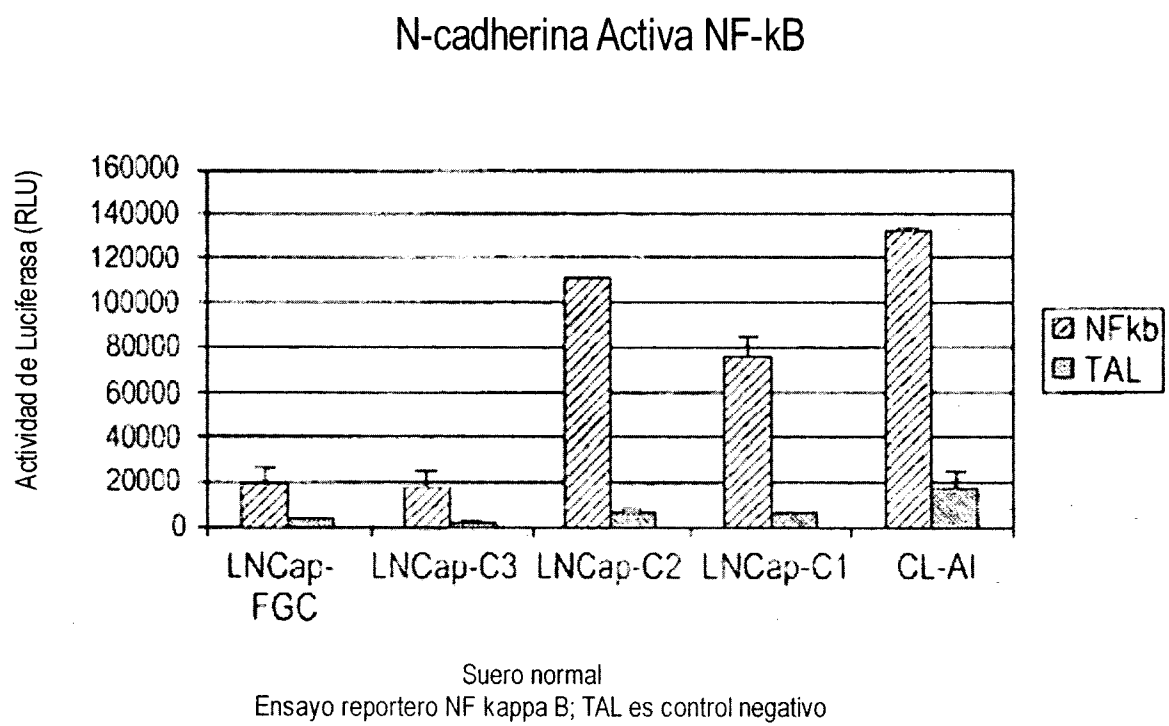


FIG. 2

as

N-Cadherina Activa NF-kB

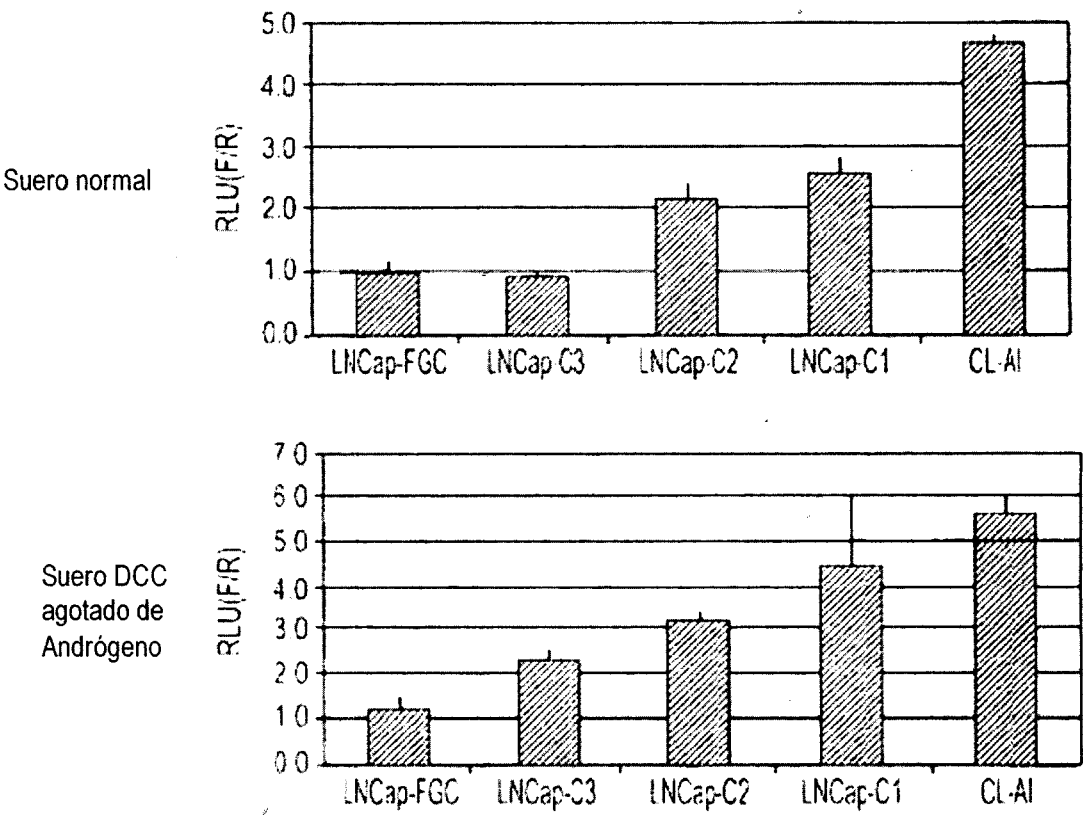


FIG. 3

N-Cadherina Activa NF- κ B

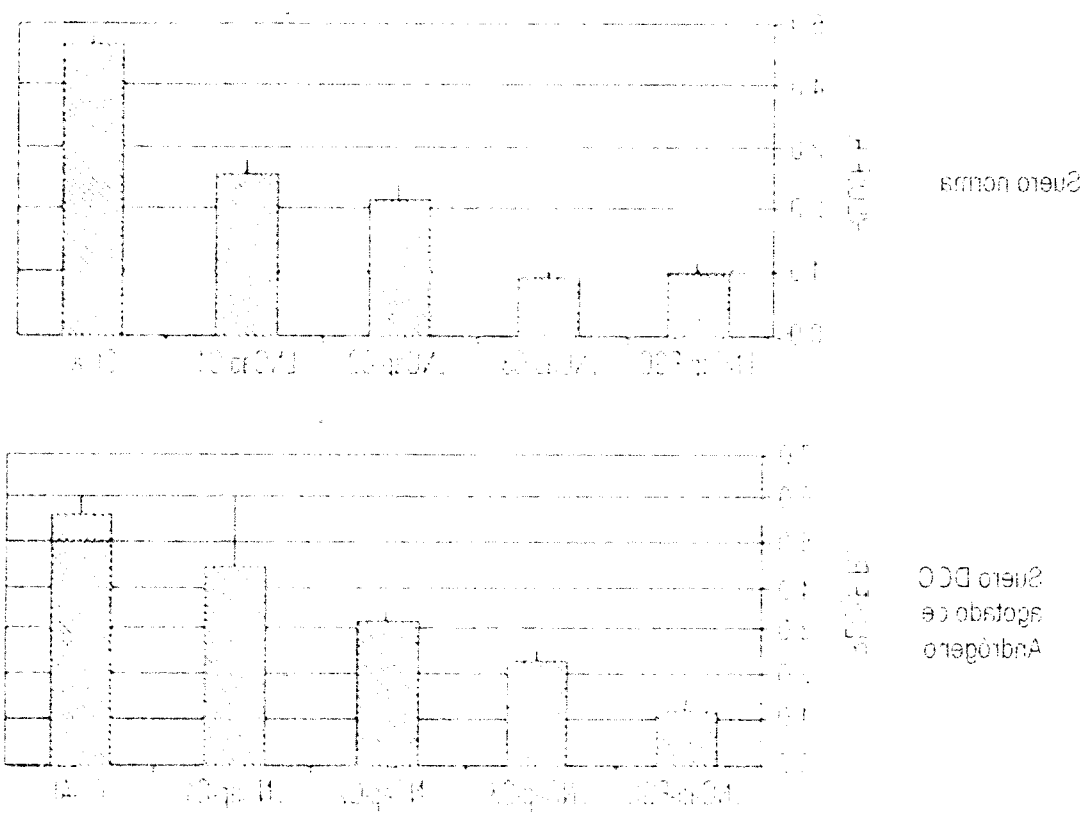


FIG. 3

N-cadherina se expresa en superficie celular de células C1

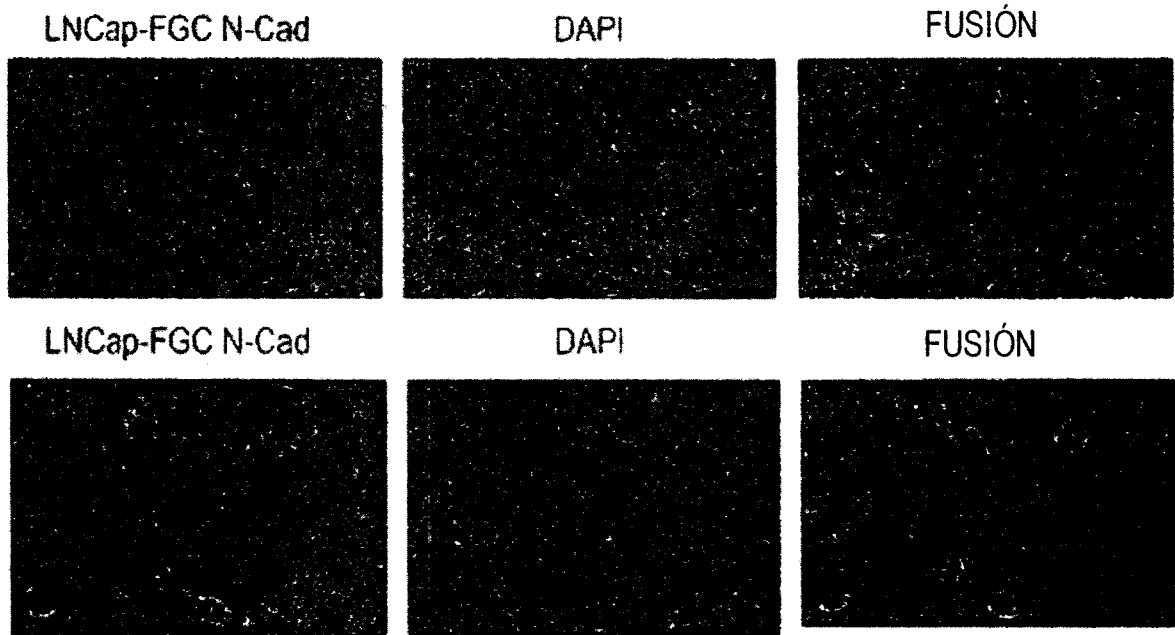


FIG. 4

N-cadherina se expresa en superficie celular de células C1

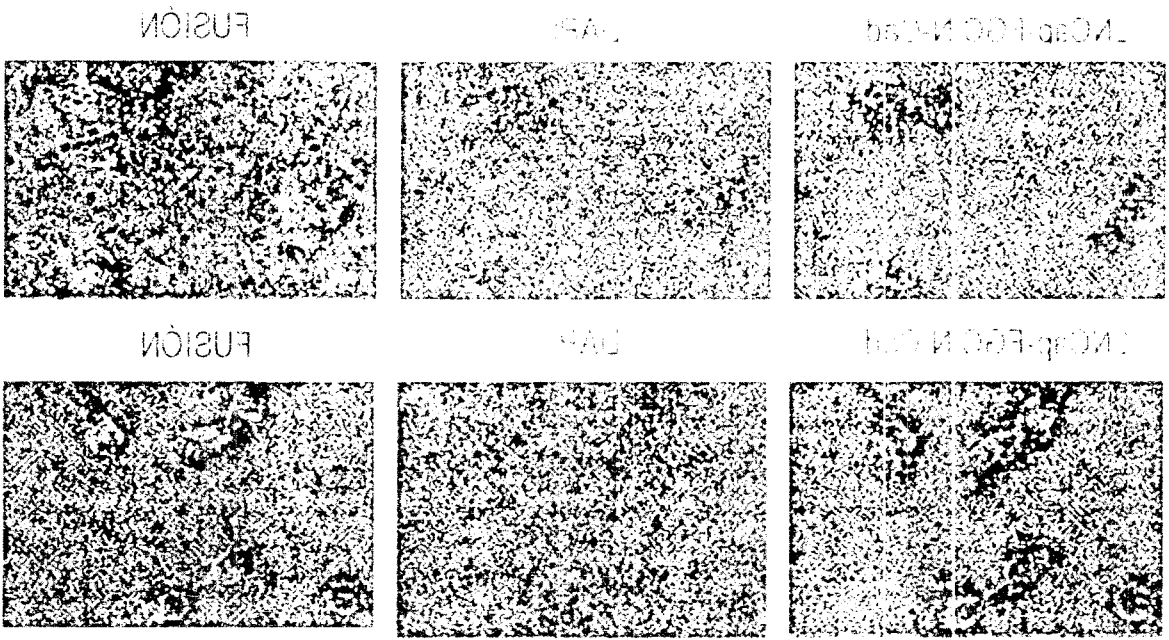


FIG. 4

NF-kB localiza a N-Cadherina núcleo
células positivas (C1)

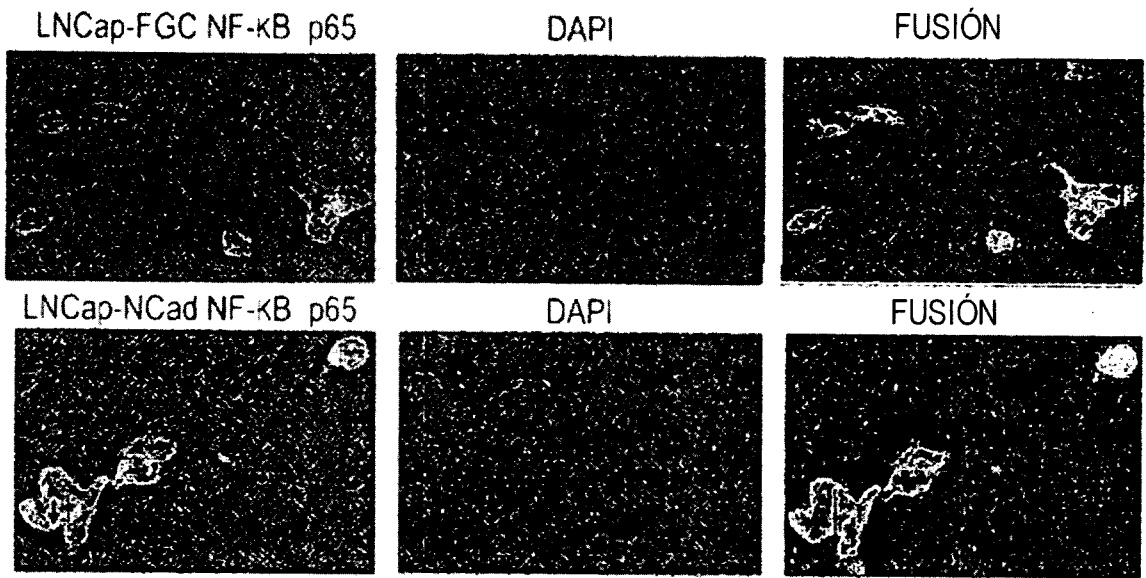


FIG. 5

células positivas (C1)
NF- B localiza a N-Cadherina núcleo

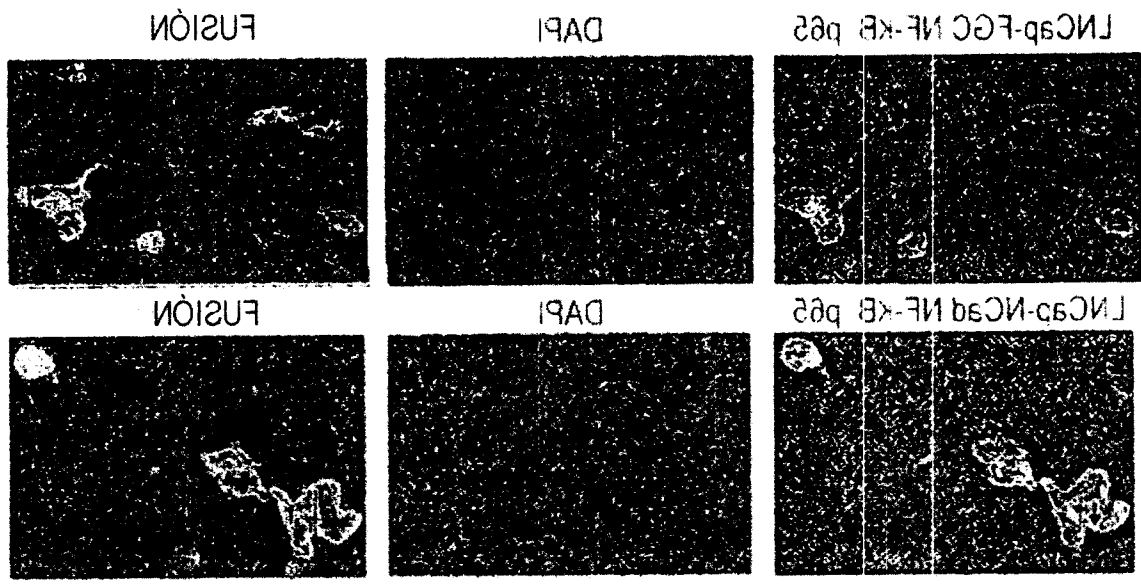


FIG. 5

Expresión de N-Cadherina Resulta en Inducción
de IL-6, IL-8, TGF β 2, y bcl-2

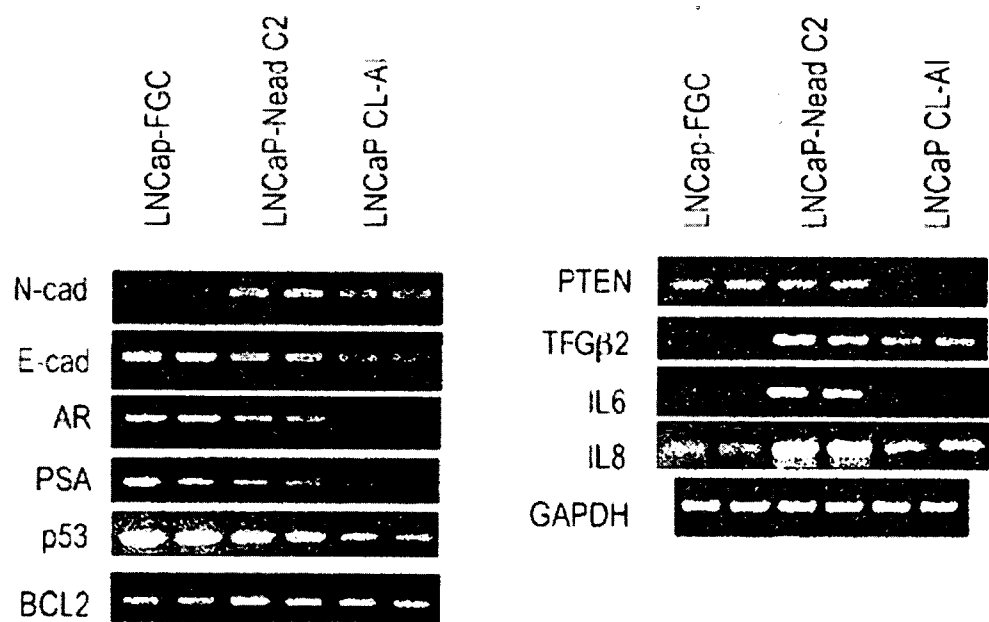


FIG. 6

Expresión de N-Cadherina Resulta en Inducción
de IL-6, IL-8, TGF-β2, y bcl-2

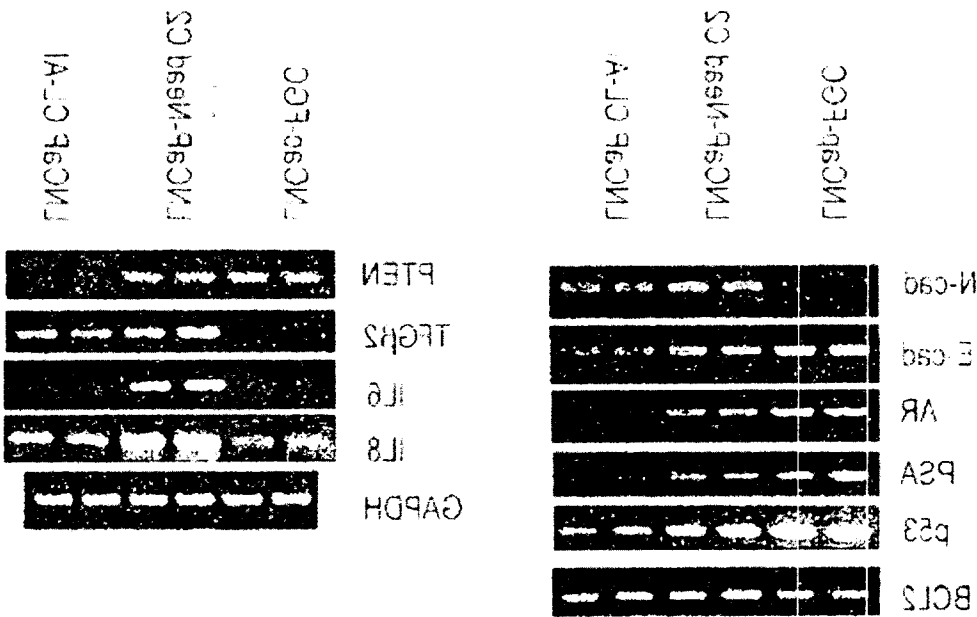


FIG. 6

Correlación de Genes Inducidos con Nivel de N-Cadherina

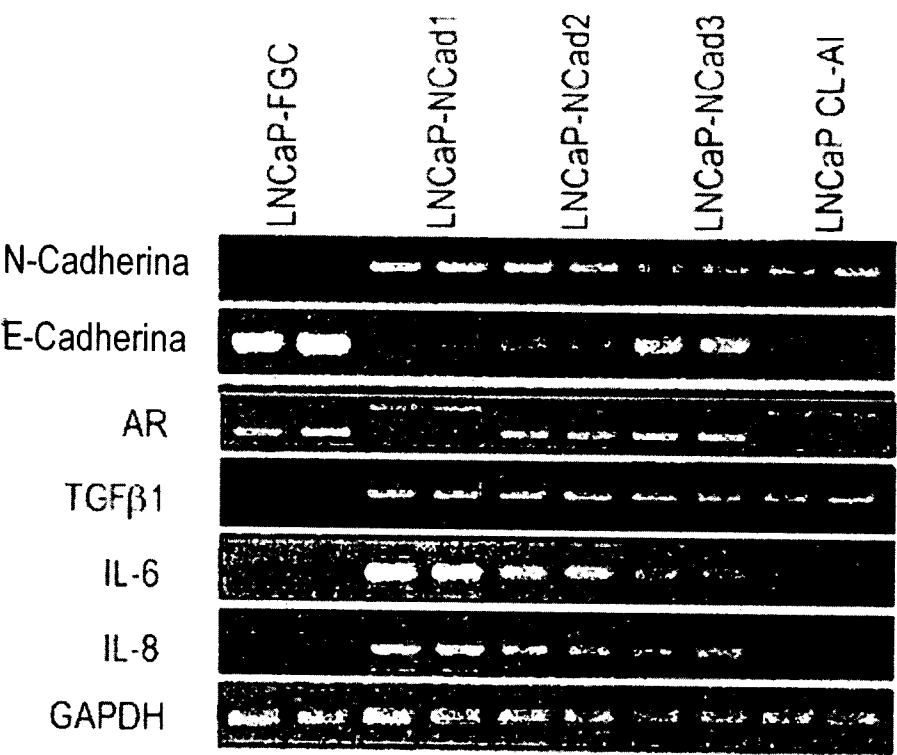


FIG. 7

Correlación de Genes Inducidos con Nivel de N-Cadherina

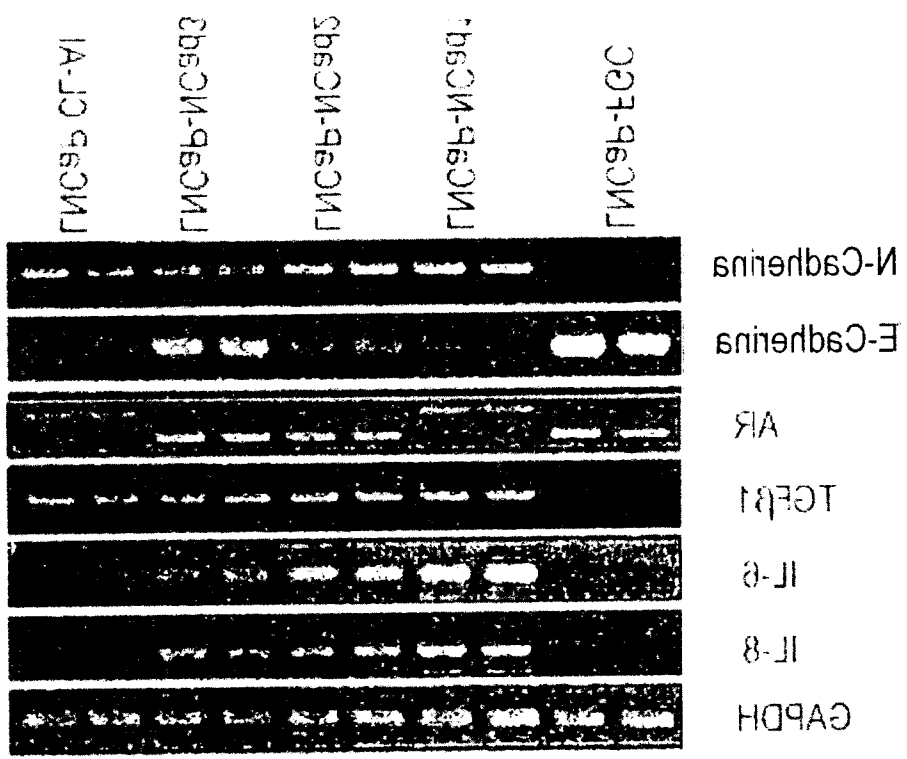


FIG. 7

Interferencia Génica de N-Cadherina lleva a la
Baja de IL-6 e IL-8

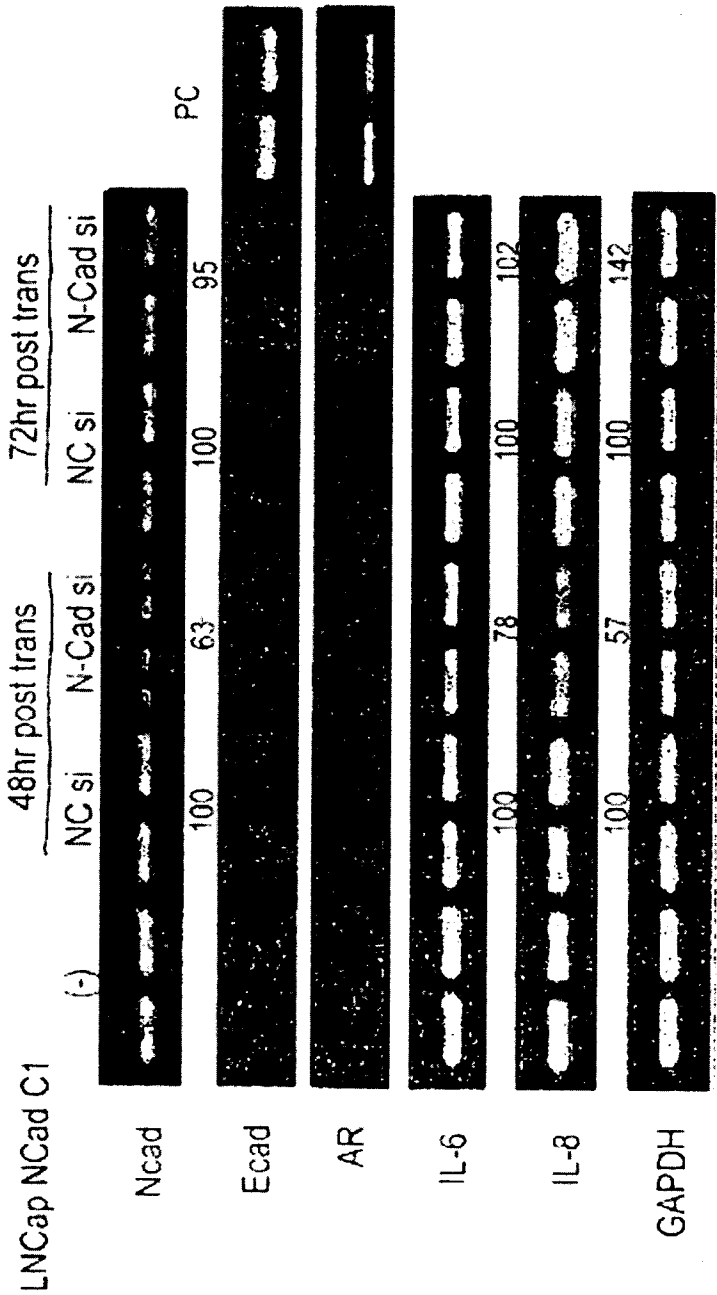
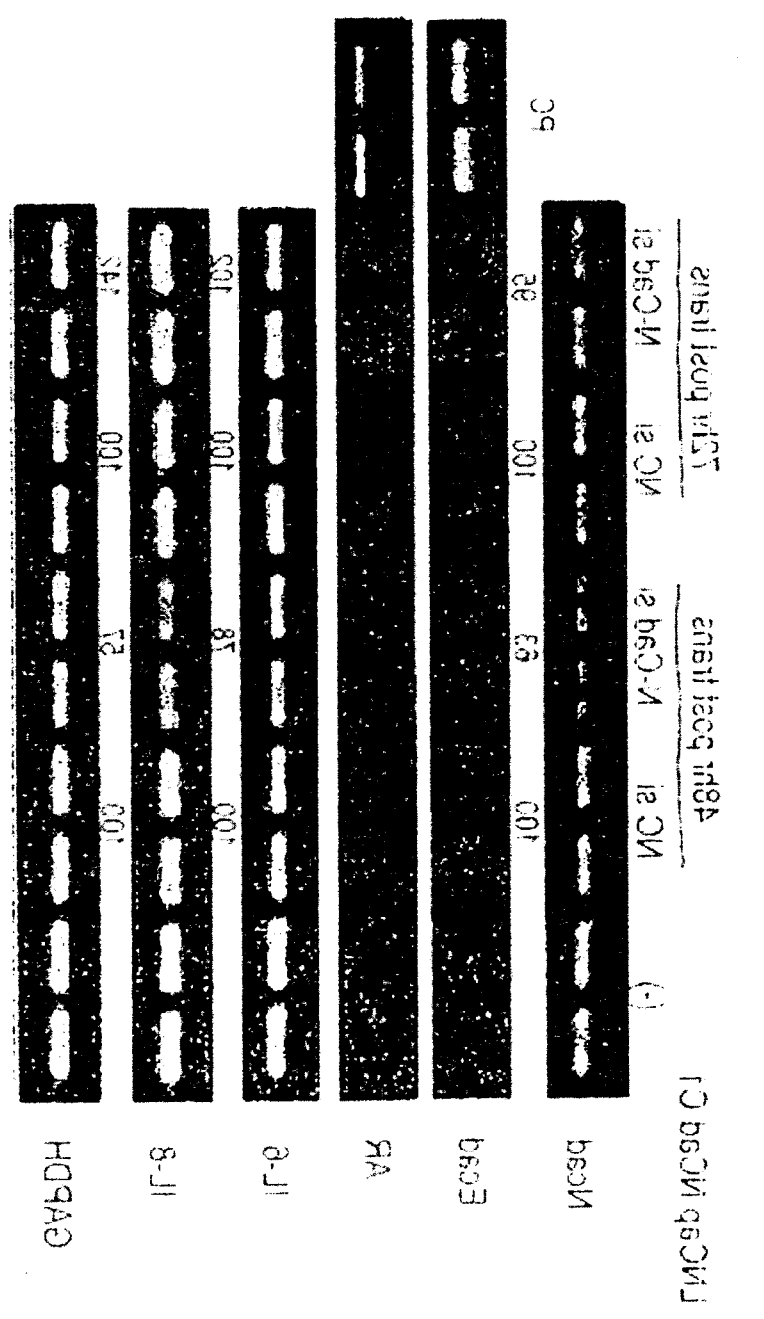


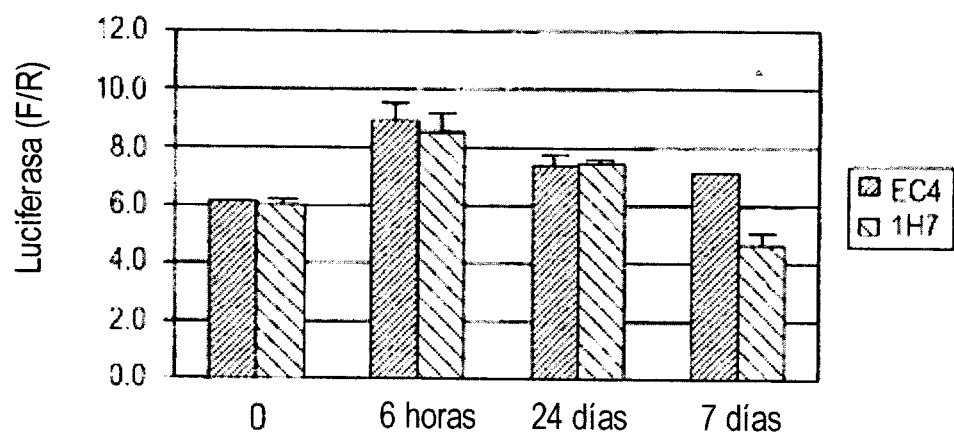
FIG. 8

FIG. 8



Interferència Gènica de ICAM1 i Regulació de IL-8 i IL-6

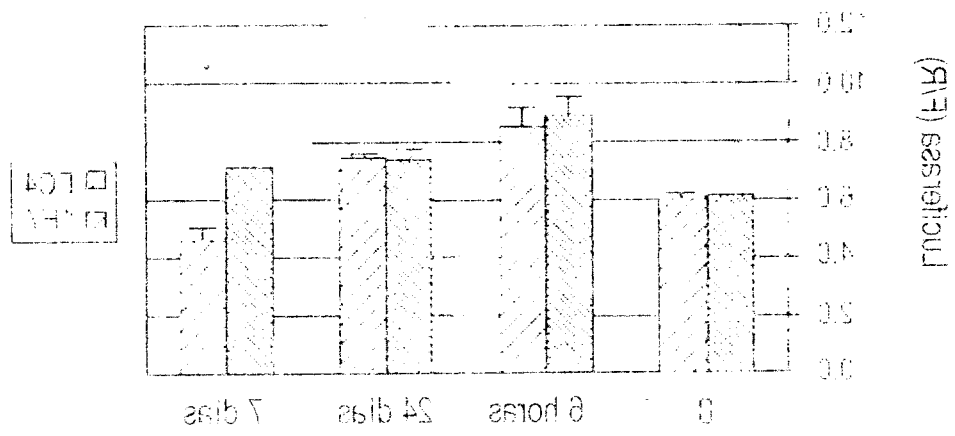
Actividad de NFkB después de tratamiento con anticuerpos de N-Cadherina



Actividad NFkB después de 7 días de tratamiento de 1H7, reducida ligeramente. Esto está de acuerdo con la transferencia Western en donde se redujo la expresión de pAkt y Ncad.

FIG. 9

Actividad de NFκB después de tratamiento con anticuerpos de N-Cadherina



Actividad NFκB después de 7 días de tratamiento de LCM, reducida ligeramente. Esto está de acuerdo con la transcripción Western en donde se redujo la expresión de pAkt y Ncad.

FIG. 9

Ncad en células PC3: Incubación de anticuerpo 48 horas
(con fibronectina)

(De previo)

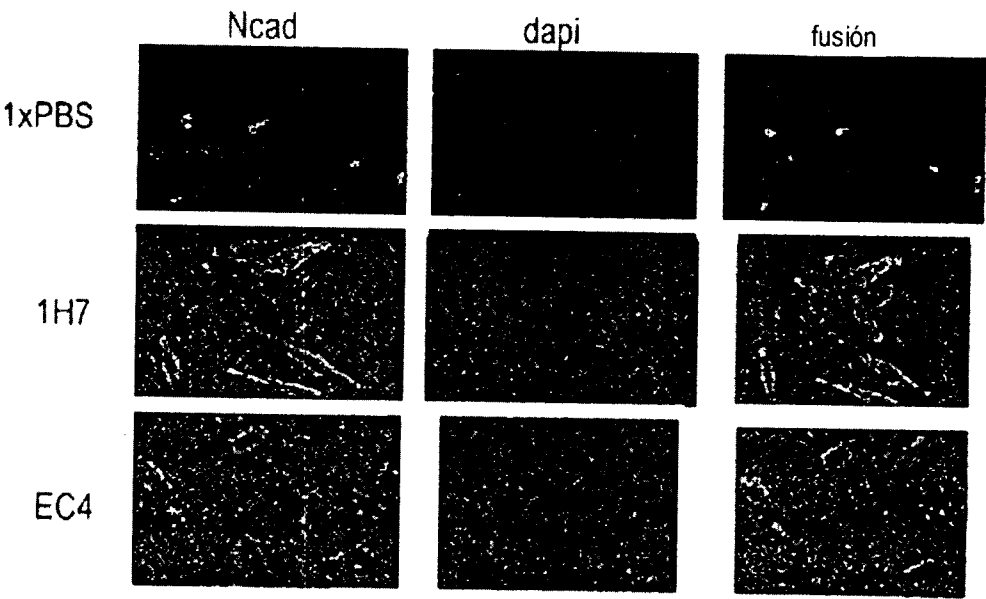


FIG. 10

Ncad en células PC3: Incubación de anticuerpo 48 horas
(con fibronectina)

(De previo)

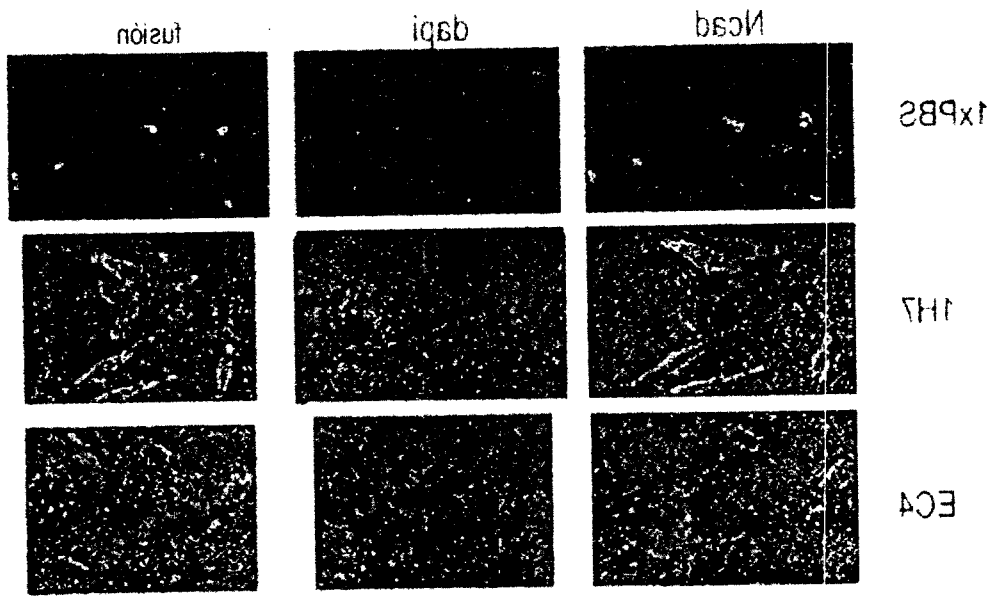
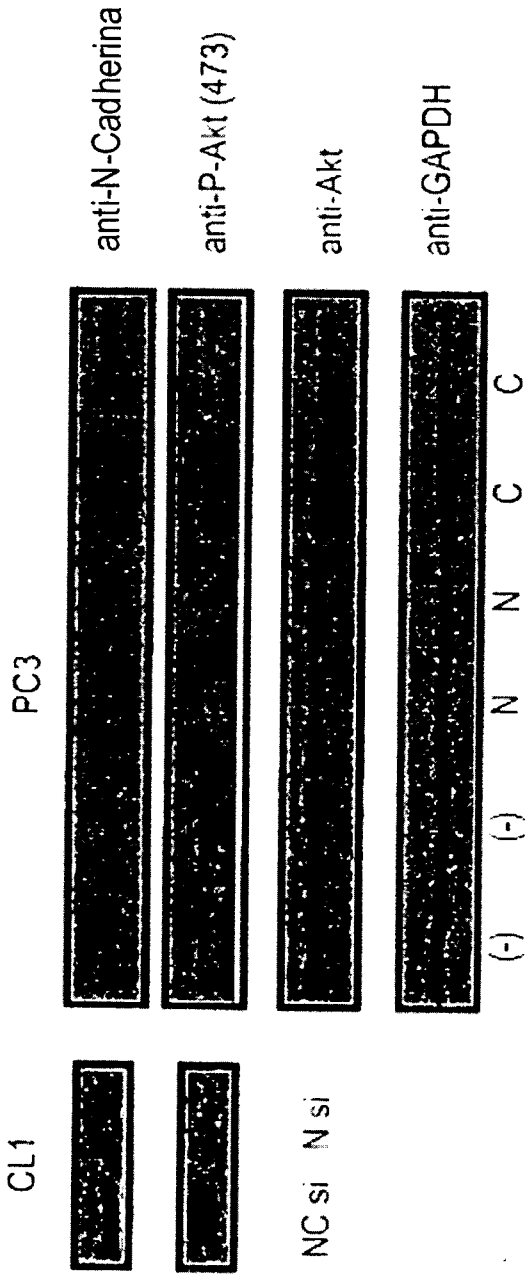


FIG. 10

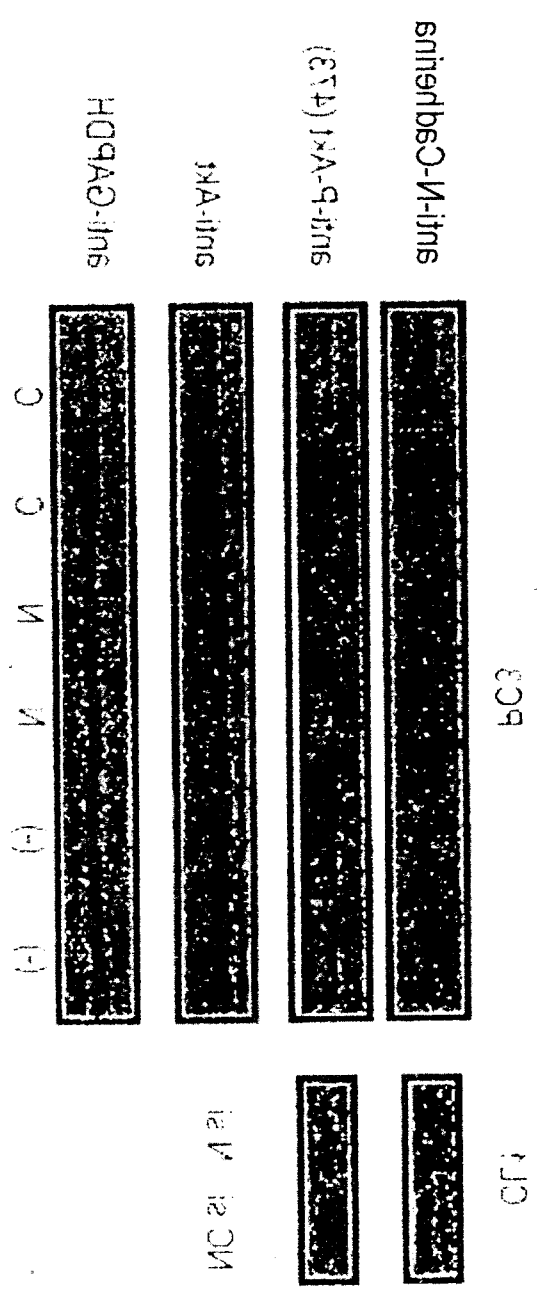
Interferencia Génica de N-Cadherina Lleva a Regulación a la Baja de Akt Activado



N y N si = ARN ip (siRNA) específico de N-cadherina; NC si C son controles

FIG. 11

Intensitat de fluorescència de l'ADN i de l'ARN en el subratllat de la BSA



11/33

Fig. 1

Intensitat de fluorescència de l'ADN i de l'ARN en el subratllat de la BSA

Anticuerpos específicos de N-cadherina activan, después
regulan a la baja la activación Akt

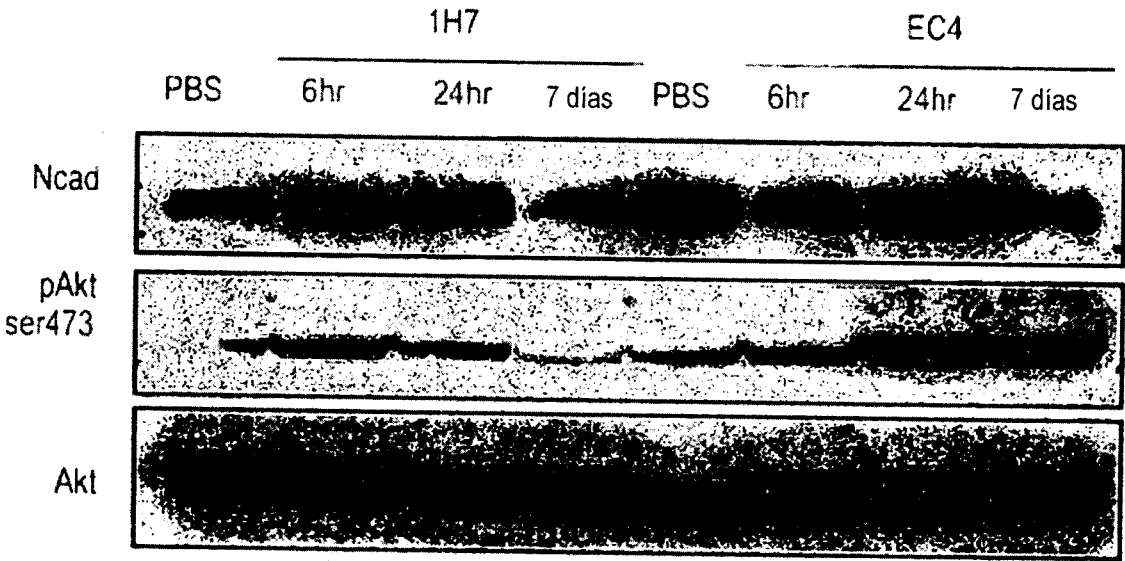


FIG. 12

Anticuerpos específicos de N-cadherina activan, después
regulan a la baja la activación Akt

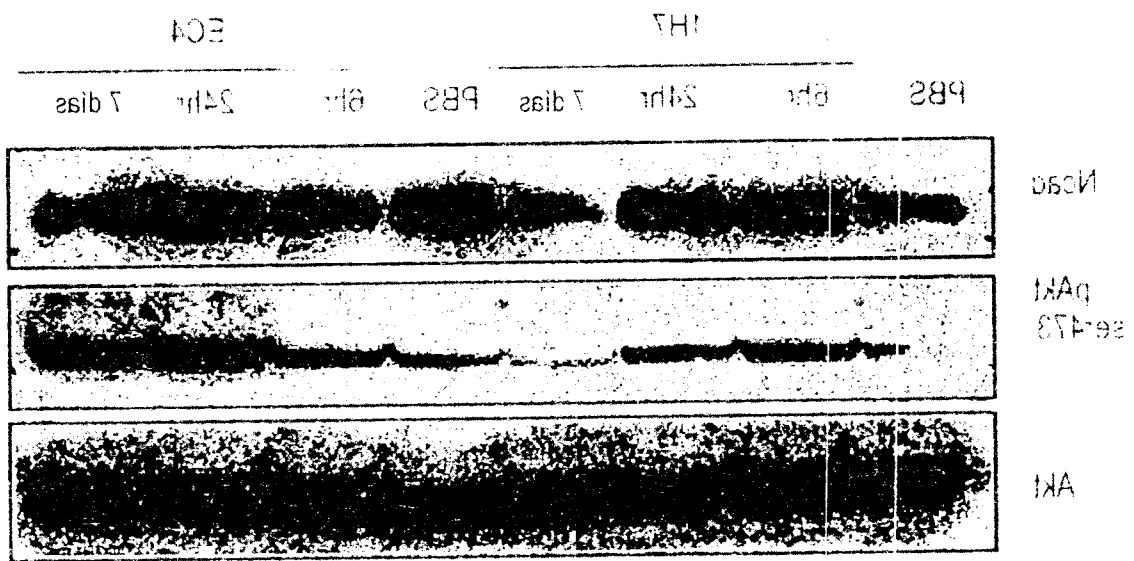


FIG. 15

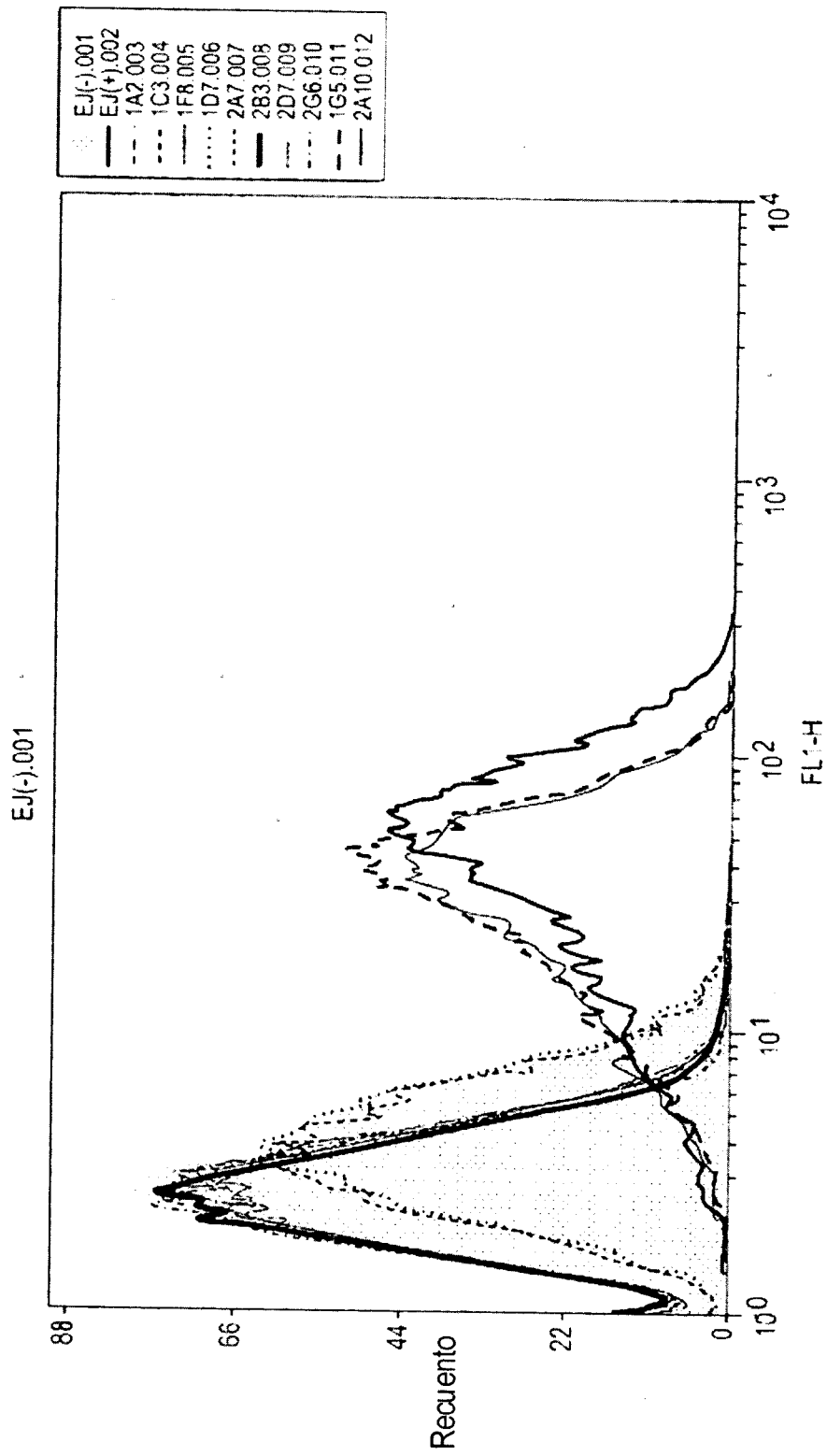
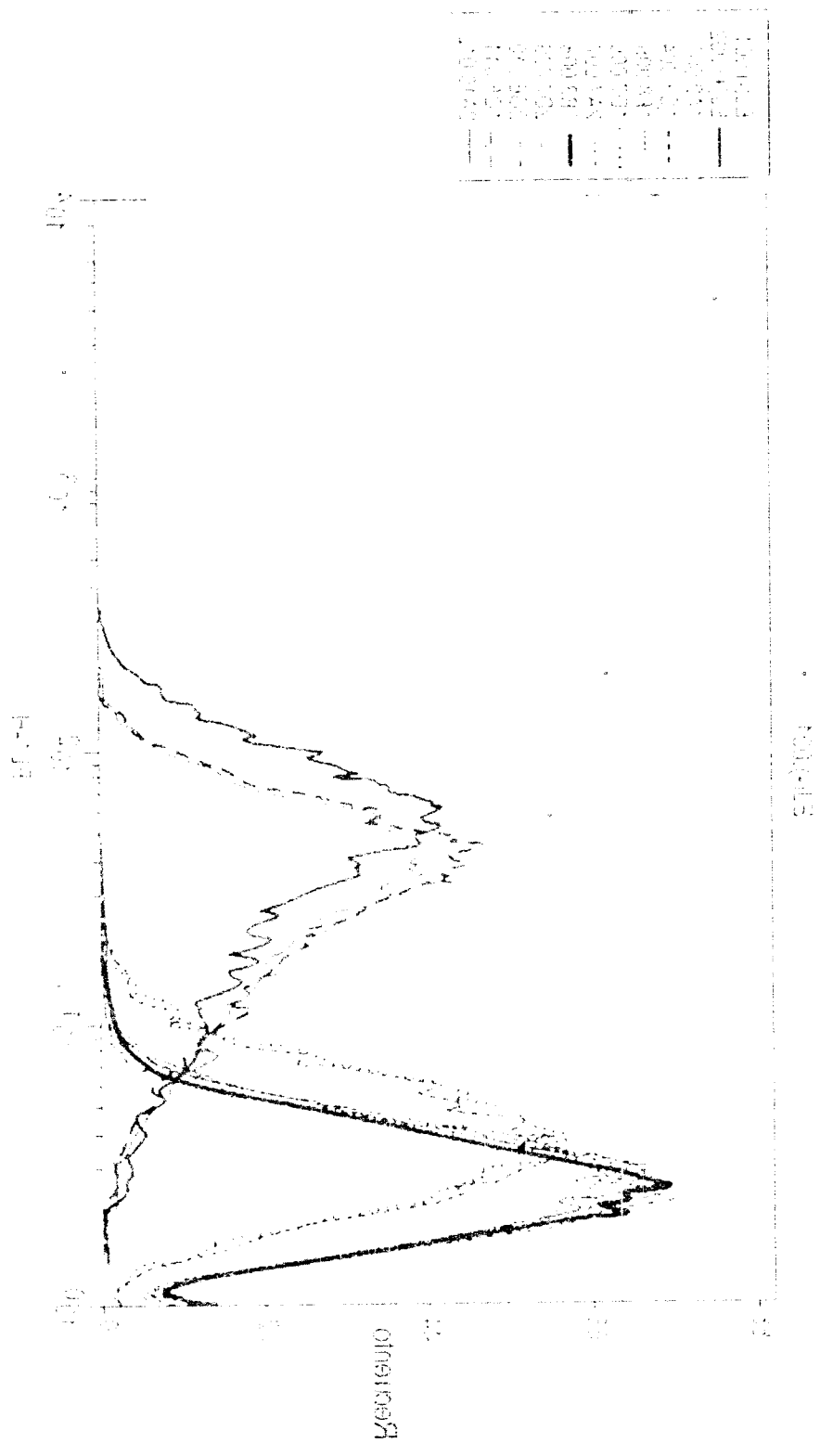


FIG. 13

FIG. 13



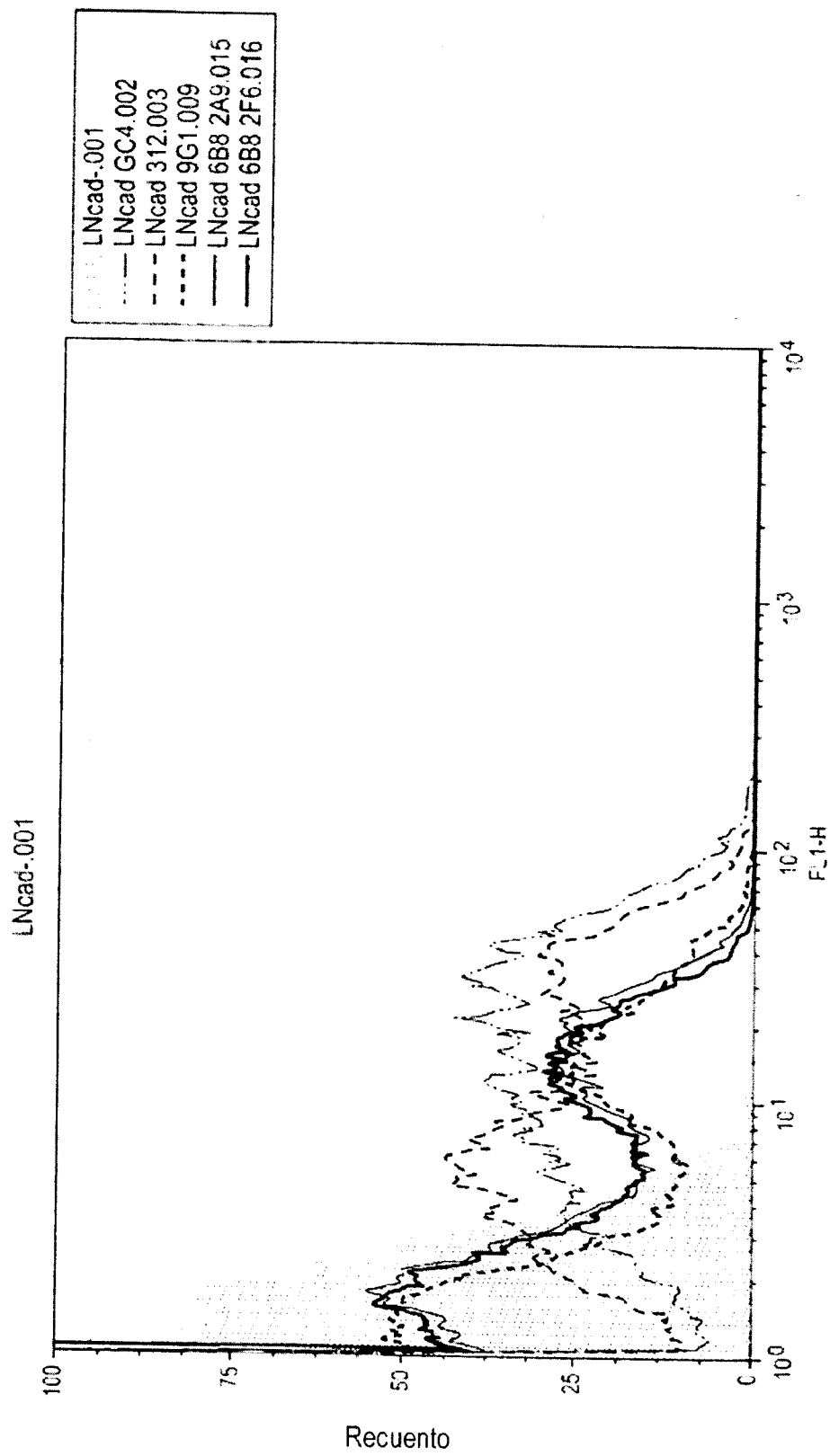
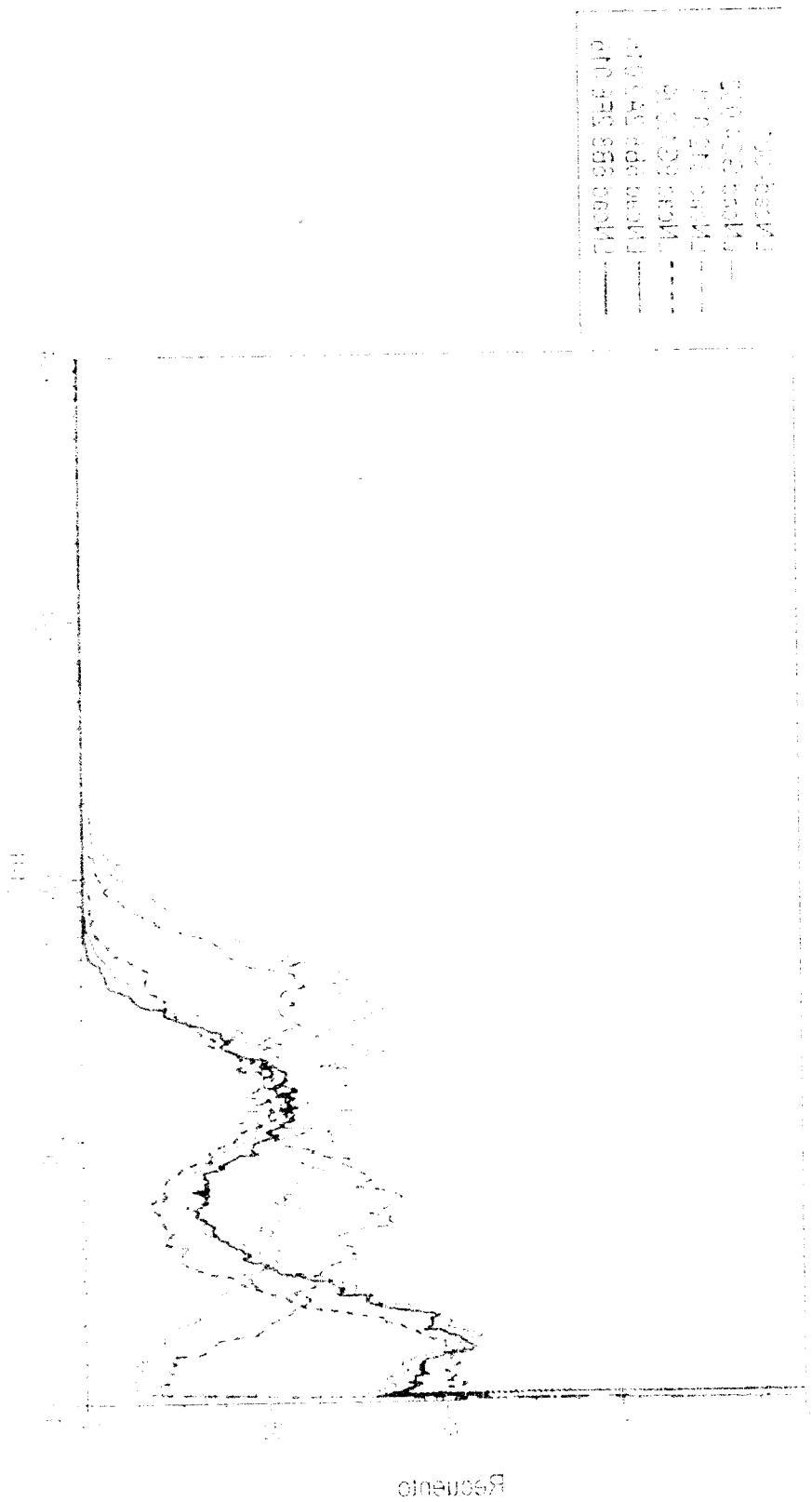


FIG. 14

FIG. 14



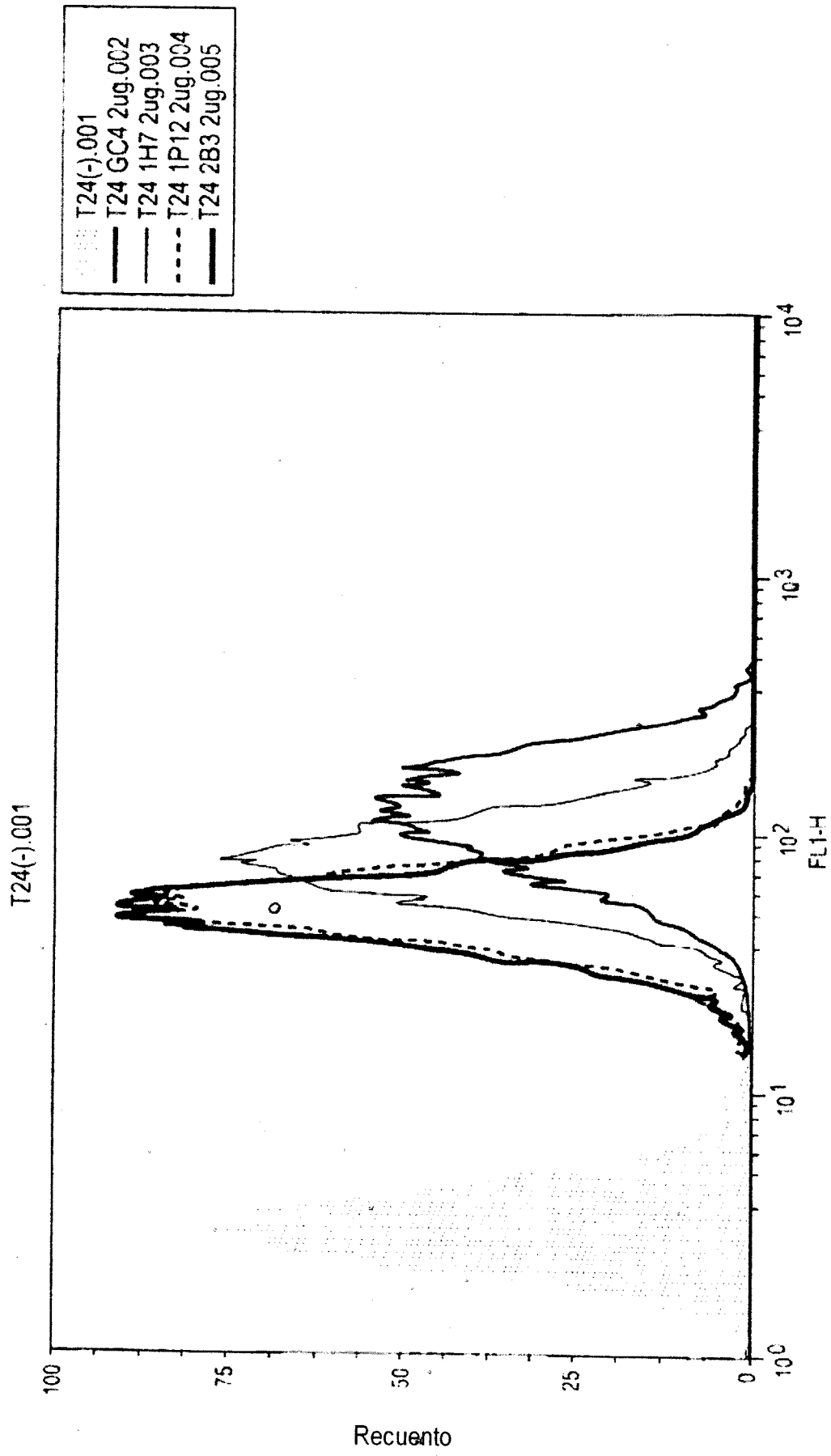
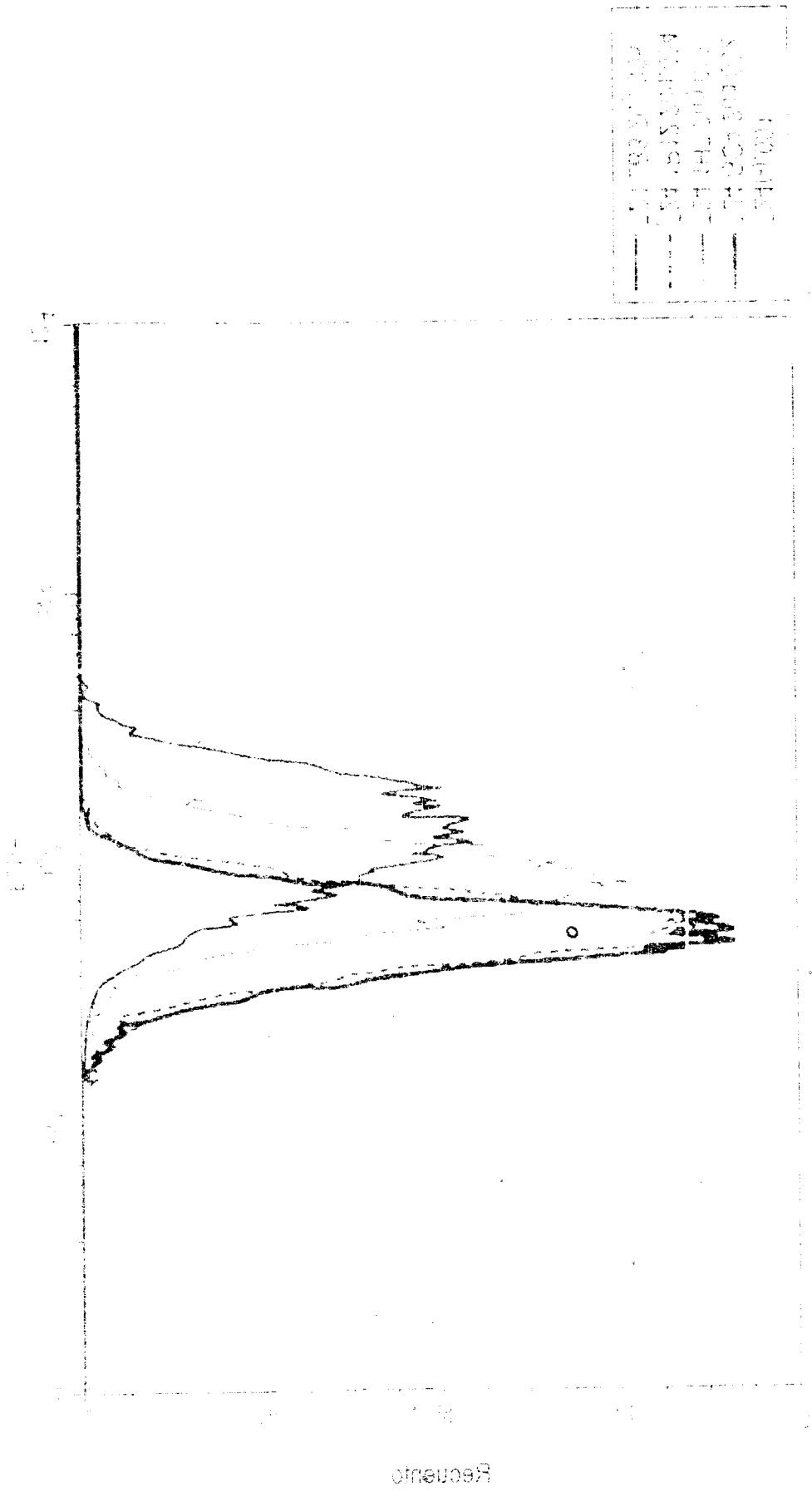
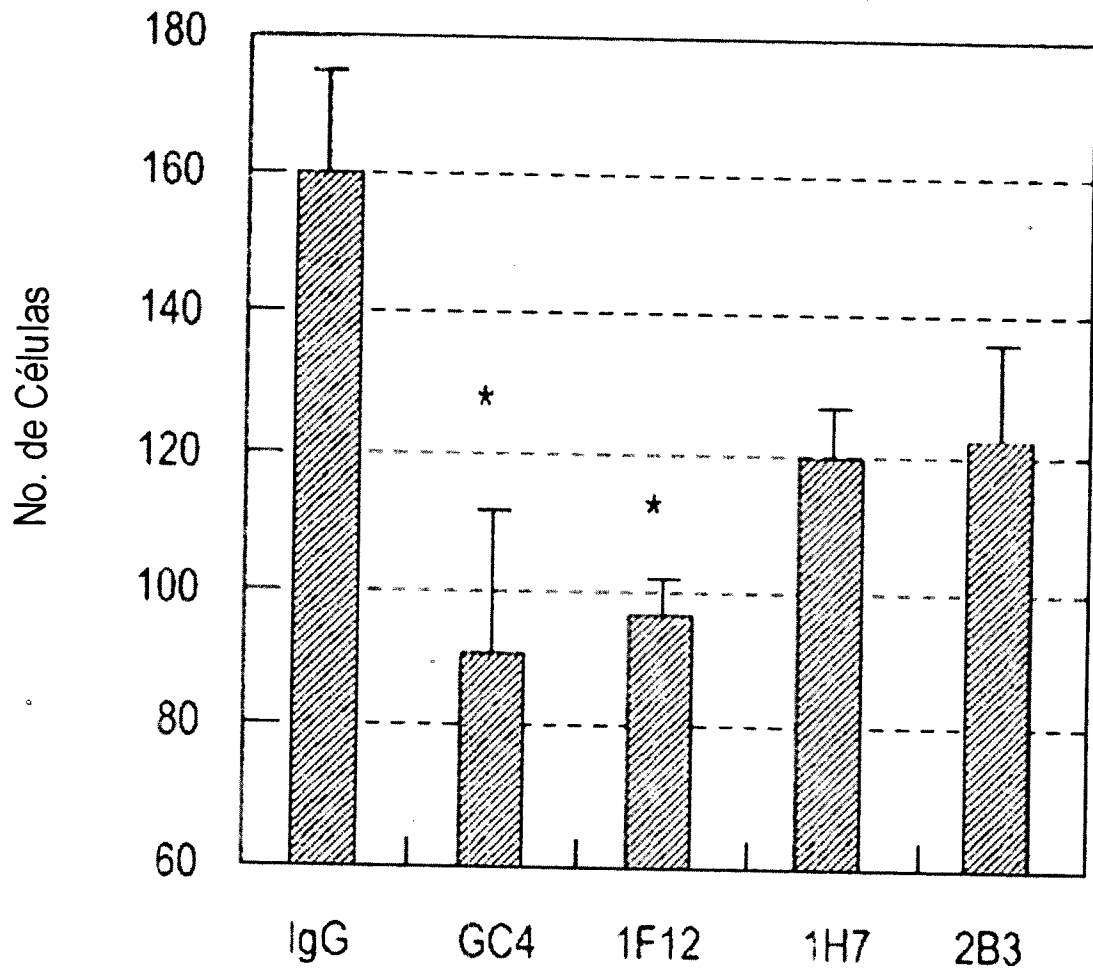


FIG. 15

FIG. 12



**FIG. 16**

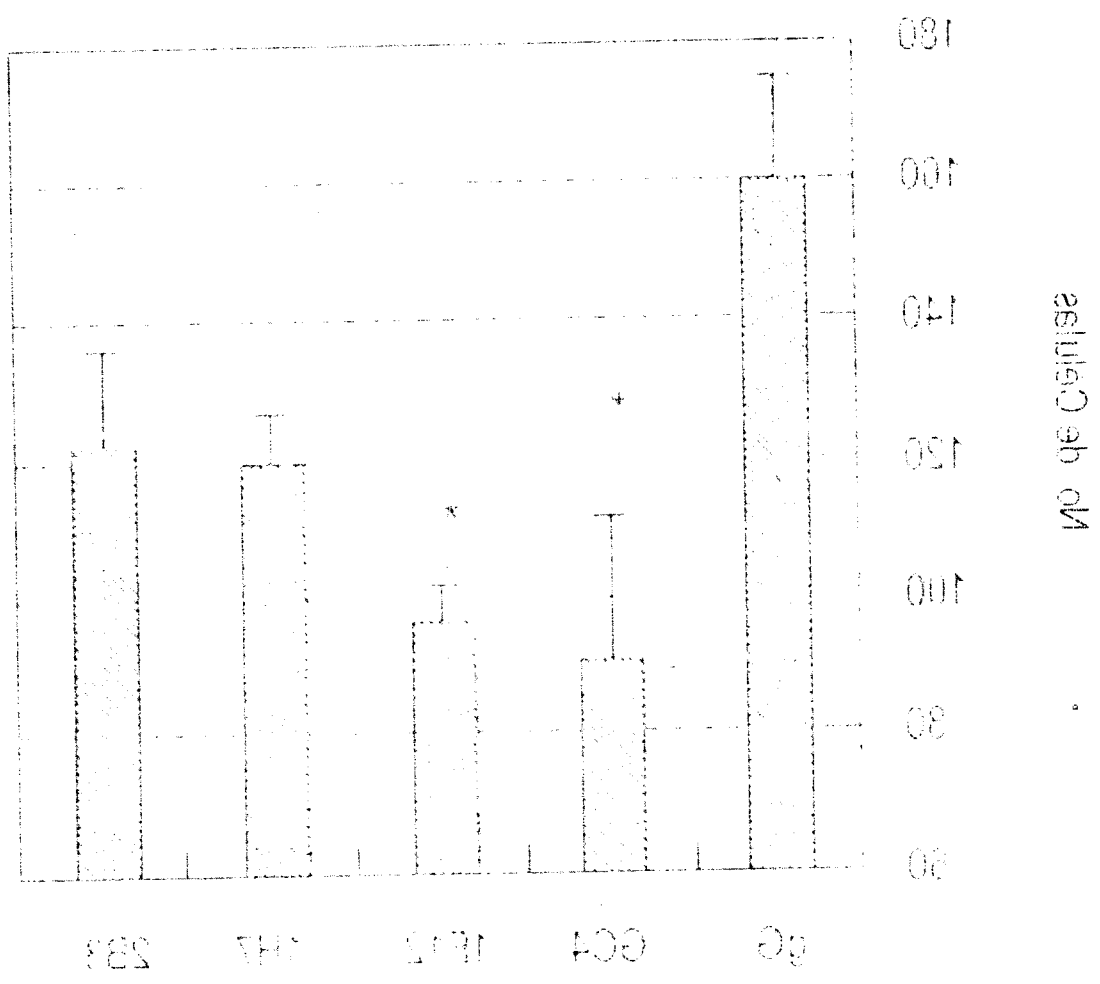


FIG. 16

Anticuerpos de N-cadherina No Tienen Efecto en
Tumores Nulos de N-cadherina (estudio de control negativo)

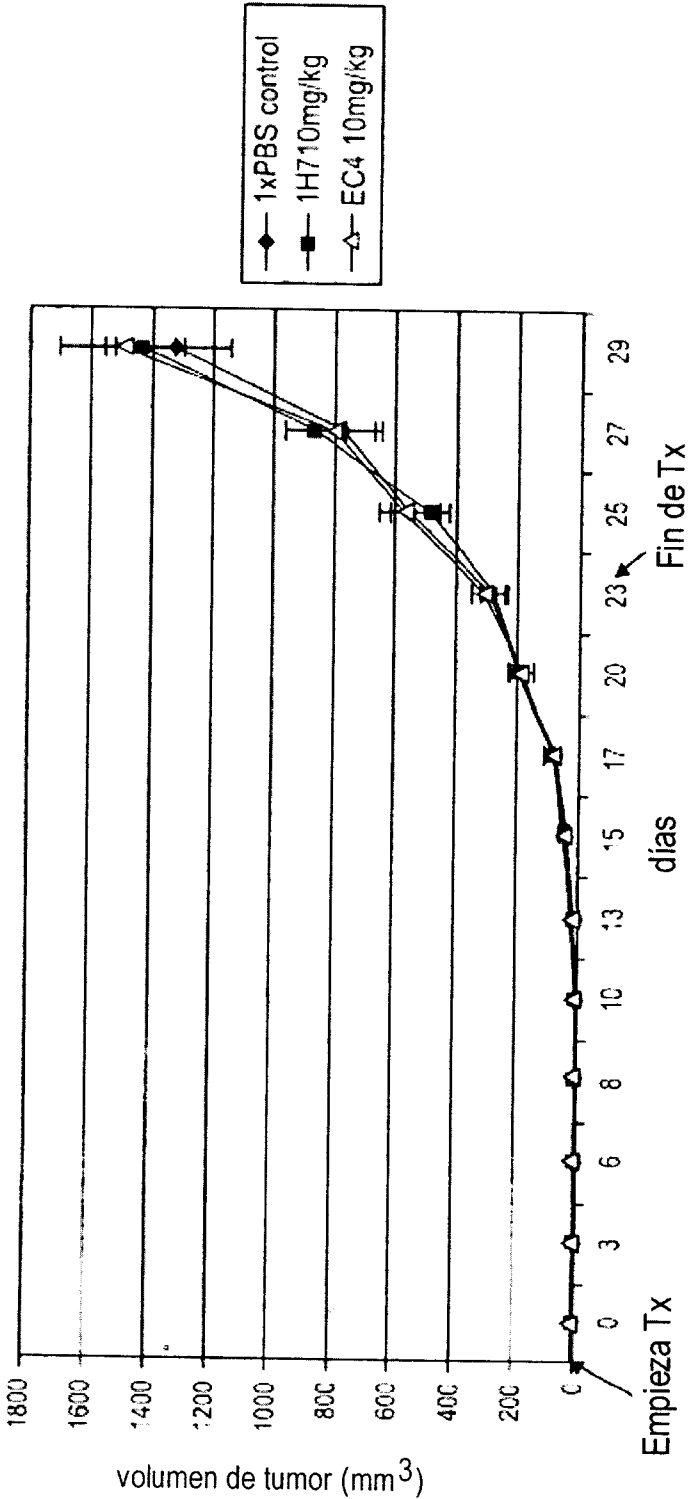
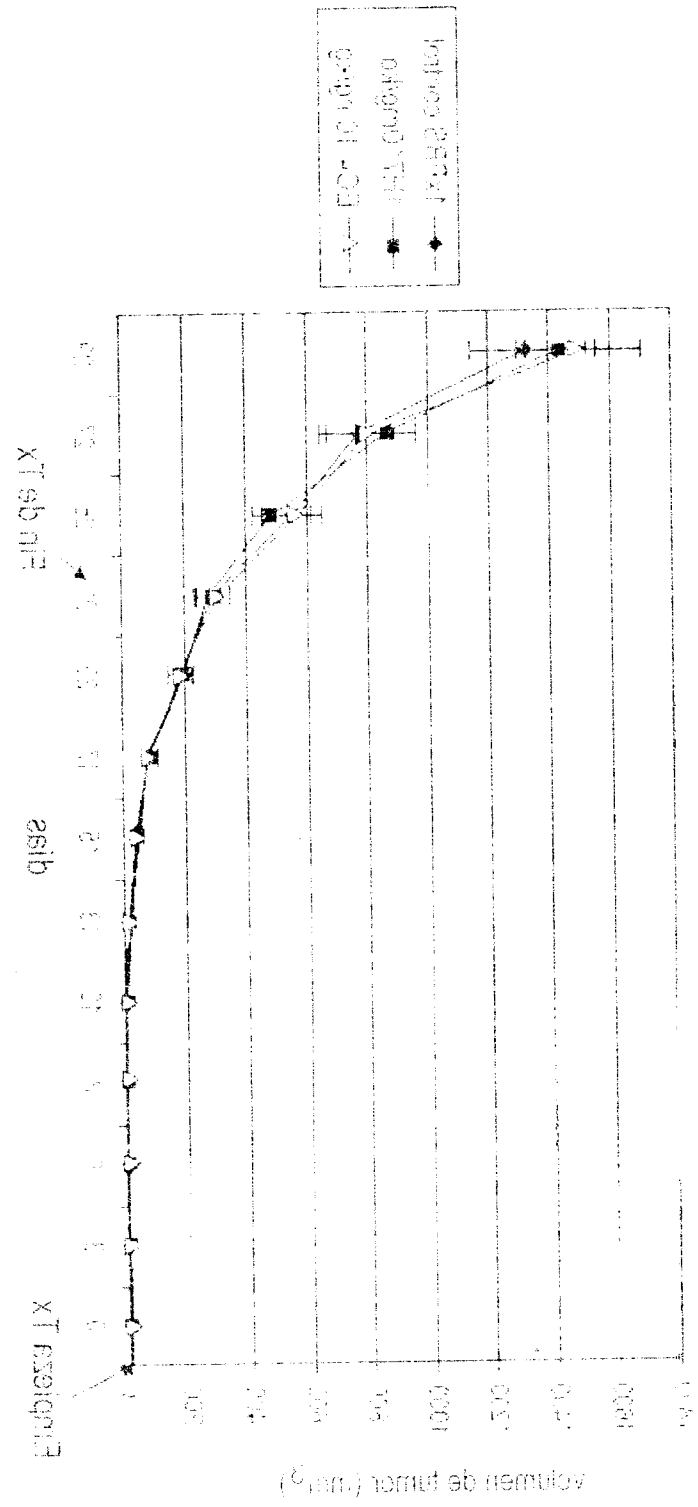


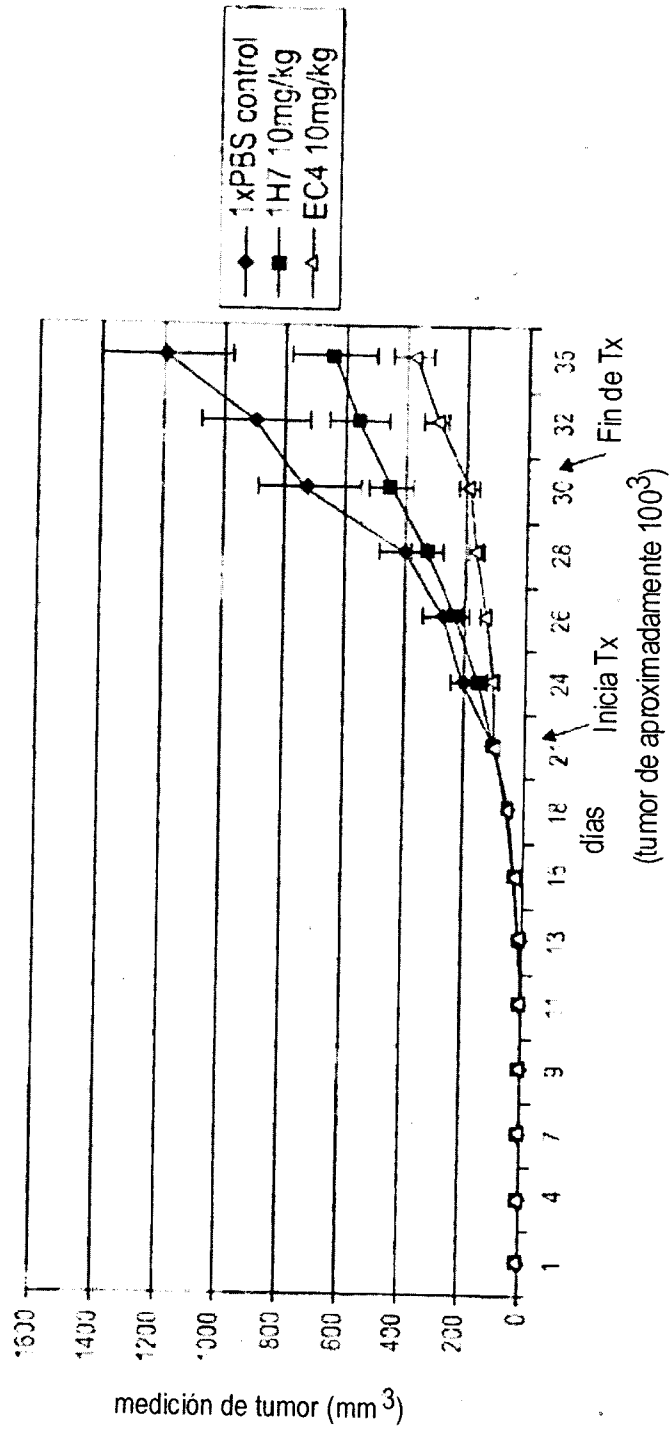
FIG. 17A

Anticuerpos de Mucosinas-M de coque en
 Anticuerpos de Mucosinas-M de coque en
 Anticuerpos de Mucosinas-M de coque en



ATP, 217

Anticuerpos de N-cadherina Inhiben el Crecimiento de Tumores PC3 Establecidos Grandes

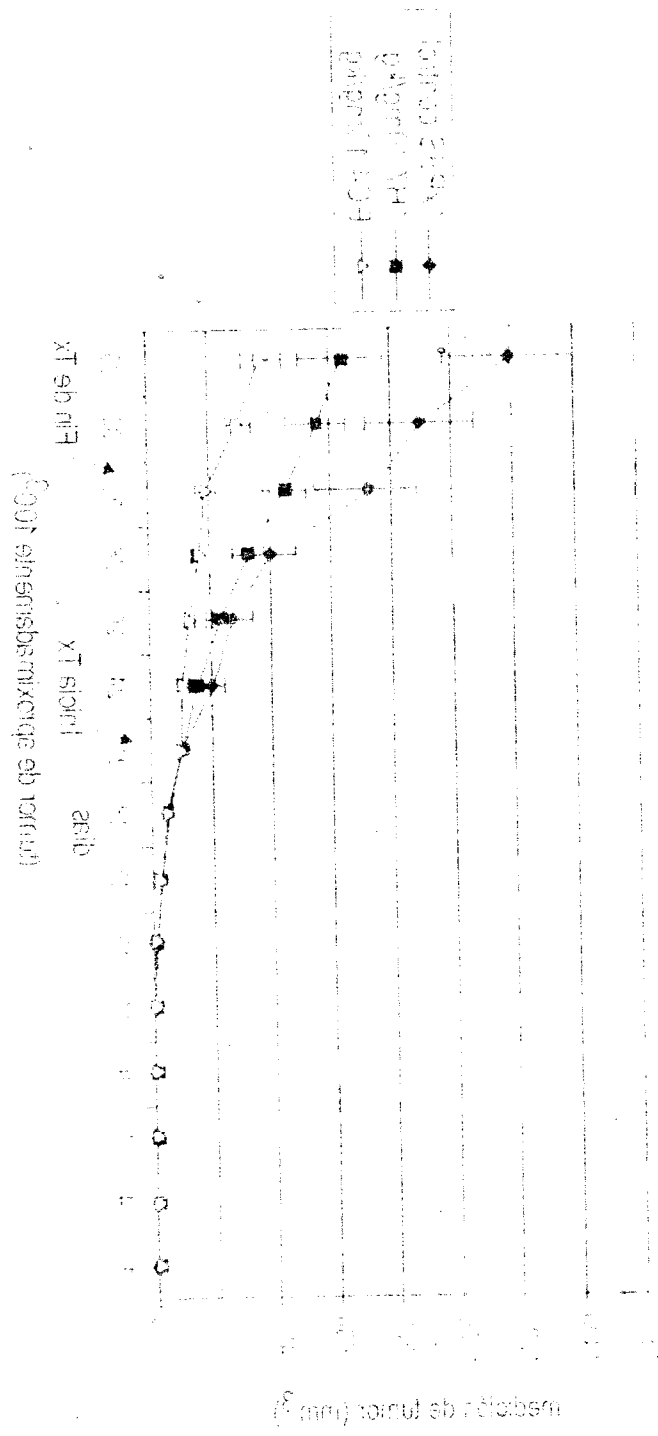


Tratamiento empezó cuando el tumor 100cc³ el día 21: 10 mg/kg dos veces por semana por dos semanas

FIG. 17C

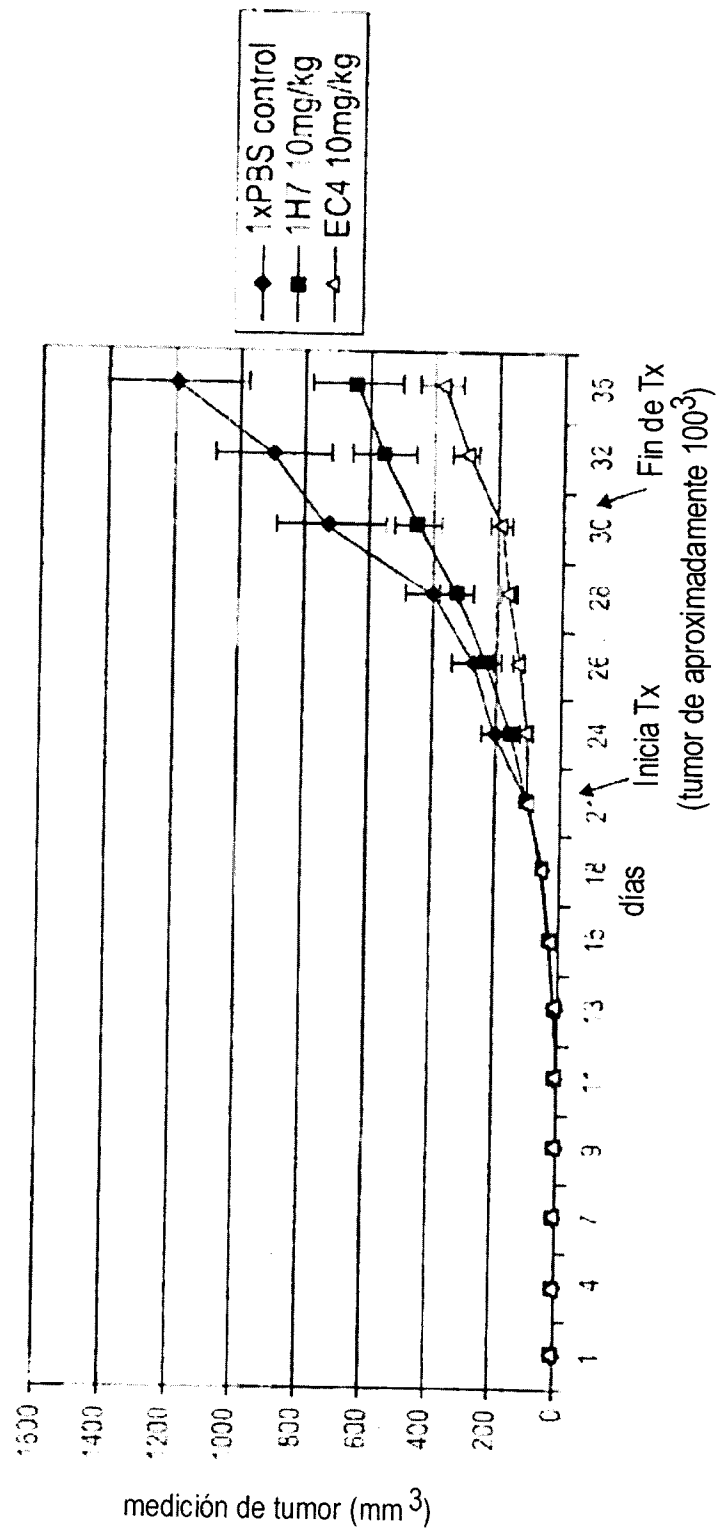
FIG. 217

asuntos ab ut q sntmna not sntv ab ut qm Cl nS ab la f0001 totut le obtuso osdome d'ntmna



Anticuerpos de M-cadherina inducen el crecimiento de
Tumores PC3 Establecidos Grandes

Anticuerpos de N-cadherina Inhiben el Crecimiento de Tumores PC3 Establecidos Grandes



Tratamiento empezó cuando el tumor 100cc3 el día 21: 10 mg/kg dos veces por semana por dos semanas

FIG. 17C

Anticuerpos de M-cadherina Inhiben el Crecimiento de Tumores PC3 Establecidos en Ratones

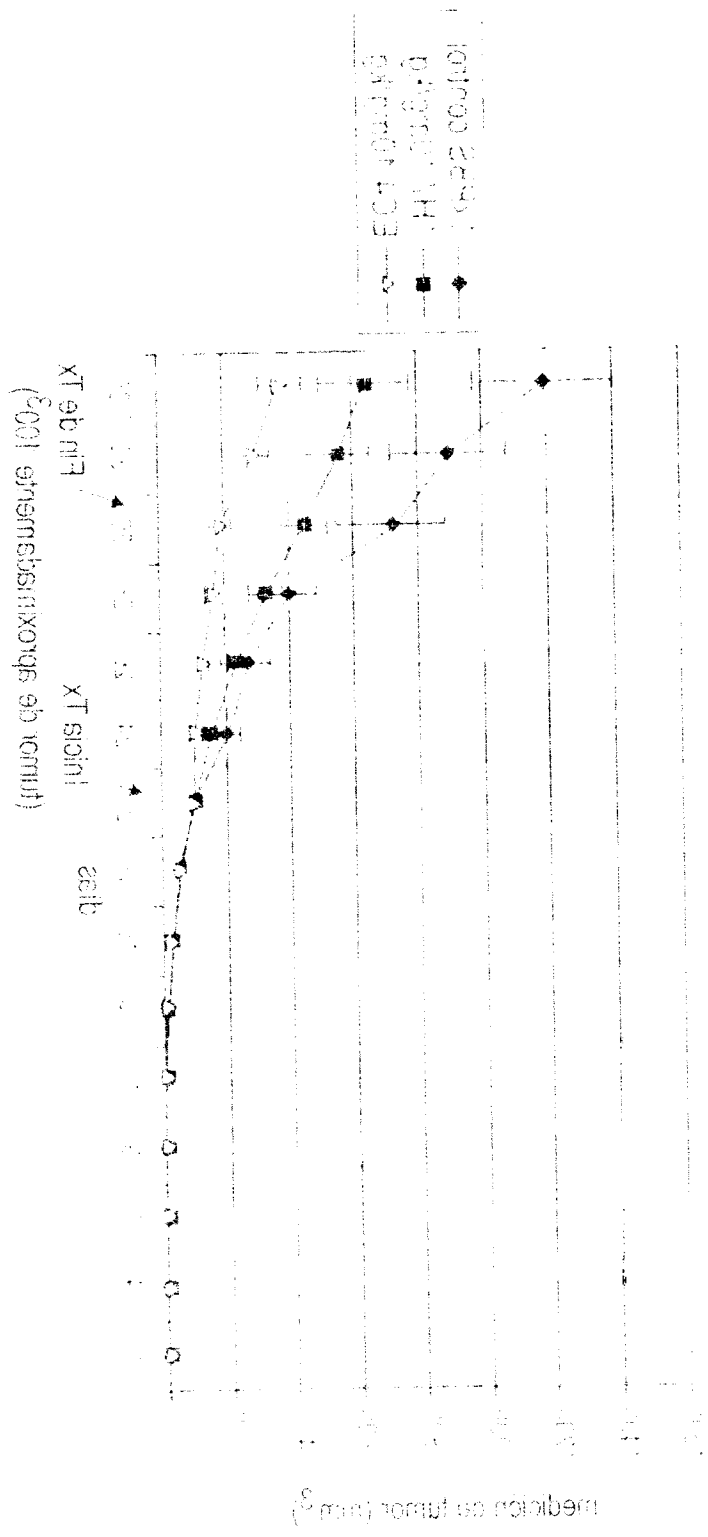


FIG. 1C

Tratamiento a Largo Plazo con Anticuerpos de N-cadherina
Inhibe el Crecimiento de Tumores PC3

Experimento de anticuerpo Ncad: Inyección a largo plazo de PC3 EC4 en desnudos

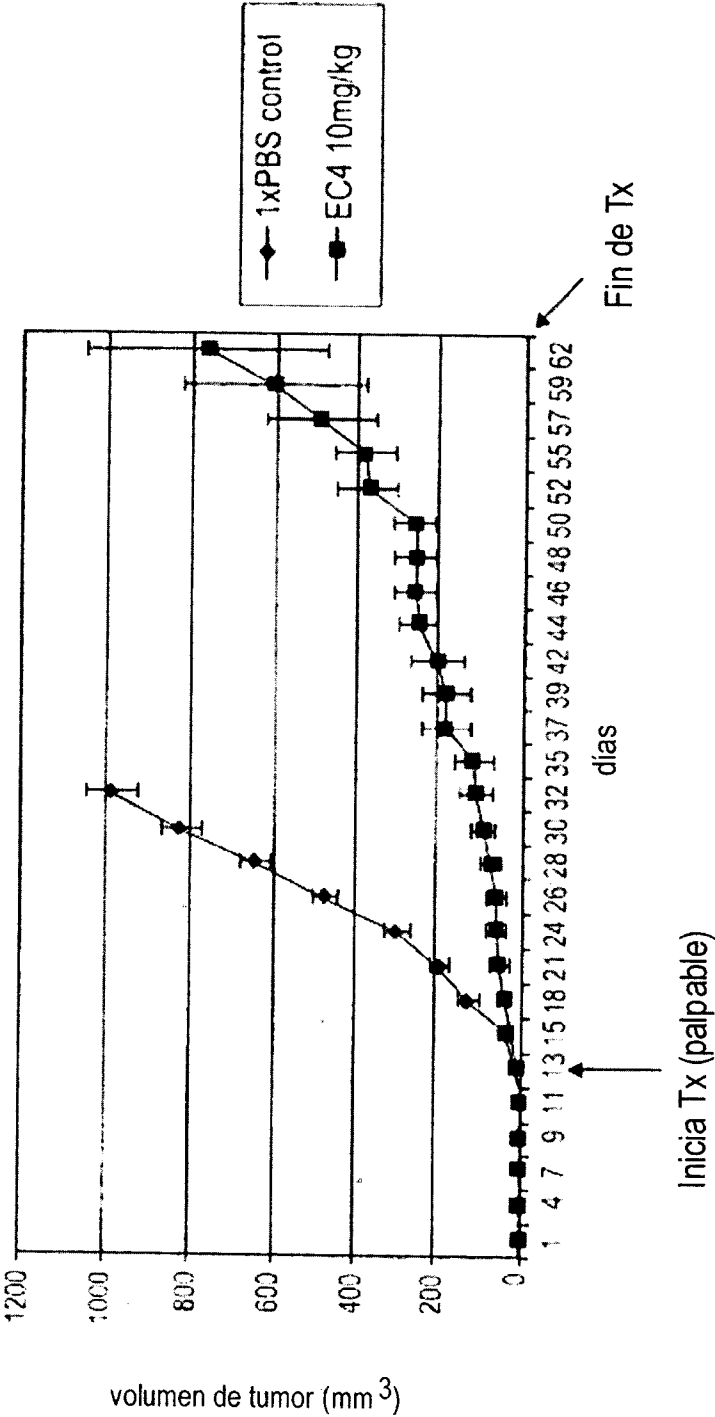
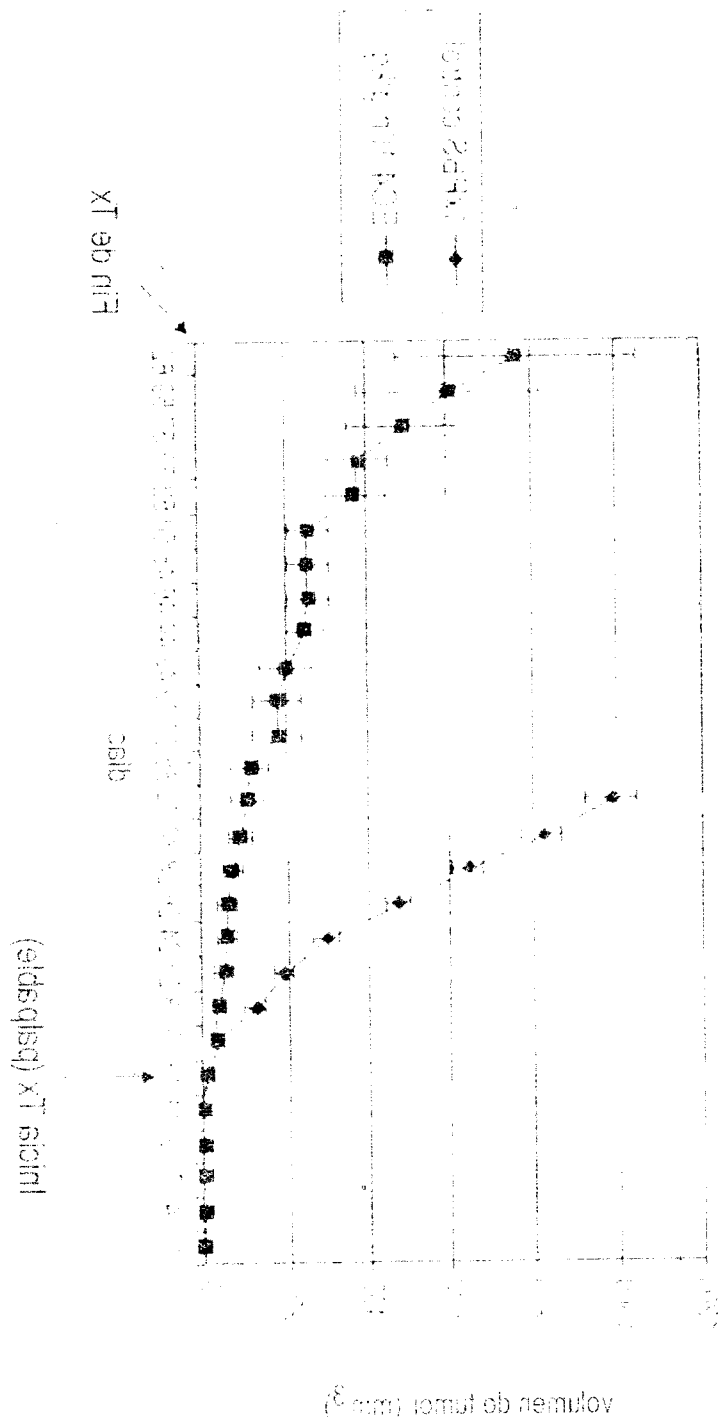


FIG. 17D

FIC. 17D



Experimento de crecimiento de tumores EC4 y EC3 en desnutrición

El crecimiento de tumores EC4 y EC3 en desnutrición

Anticuerpos de N-cadherina Bloquean Invasión Local y
Angiogénesis de tumores PC3

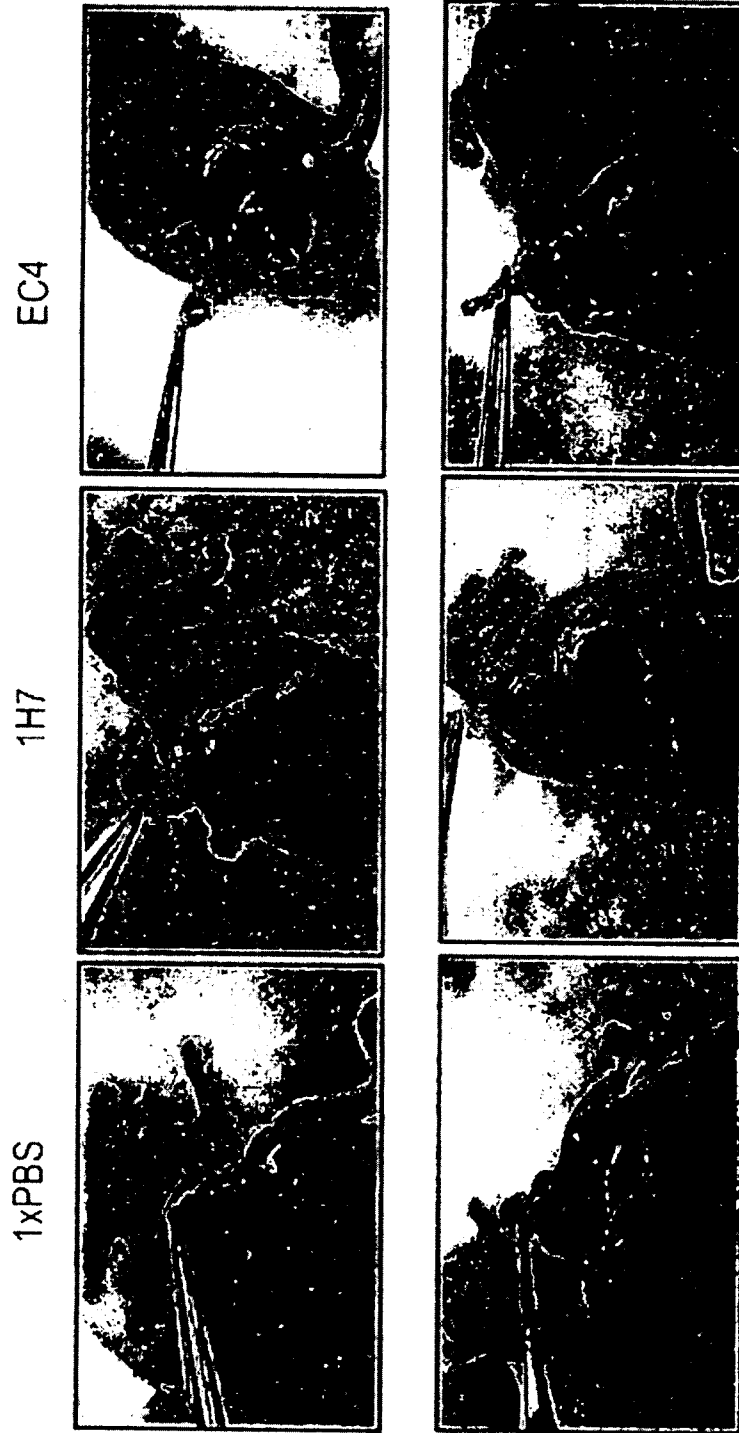


FIG. 18

12/1

Anticuerpos de V-casbherina Bloquean Invasión Local y
Angiogénesis de Tumores PC3

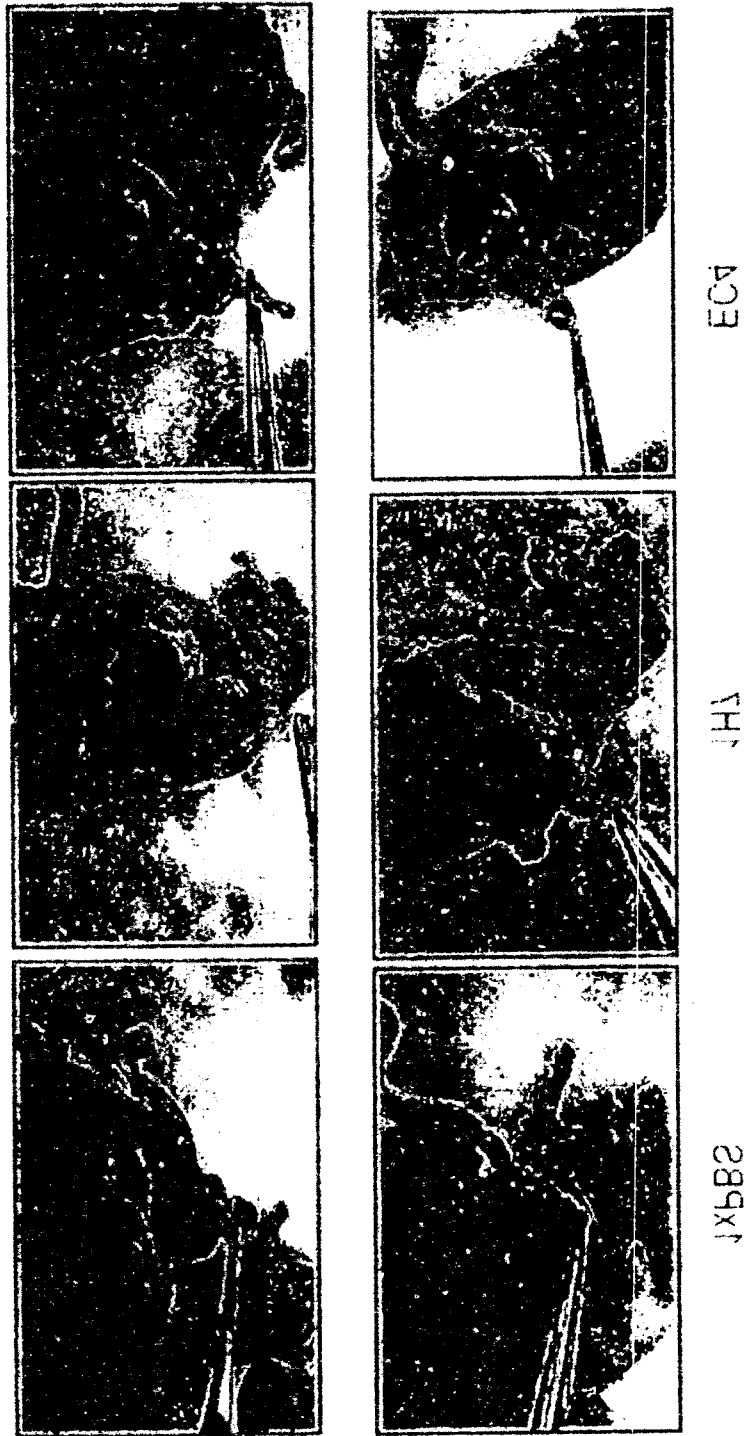


FIG. 18



FIG. 19A

Transición LAPC9AD a AI: 1xPBS vs 1H7 vs EC4

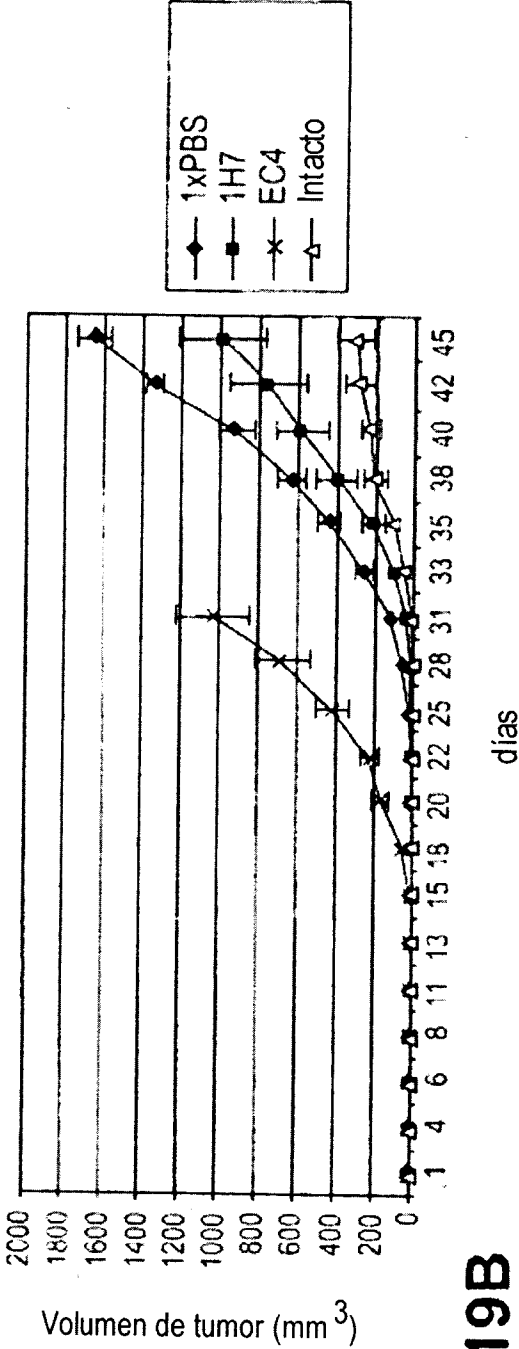


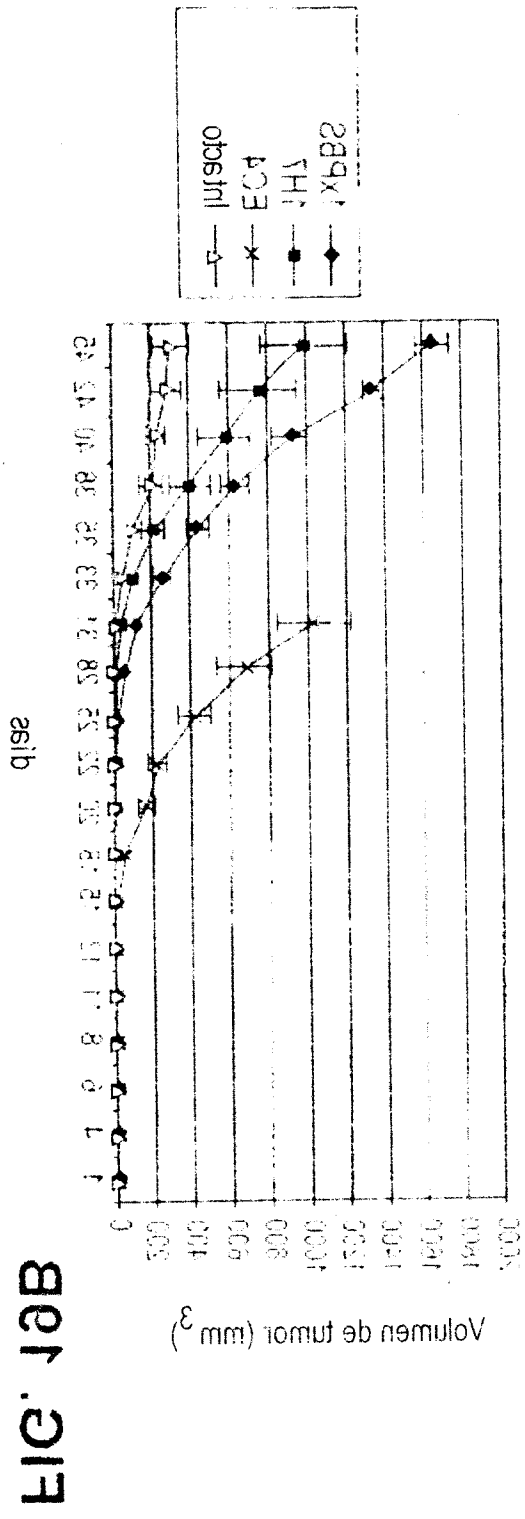
FIG. 19B



Aer .CIF

EC4 av TH1 as TPB2 :IA s DAPCPAL nòiciansIT

33\33



Curva de Crecimiento de Tumor de LAPC9AI clasificado

LAPC9AI clasificado en SCIDs castrados

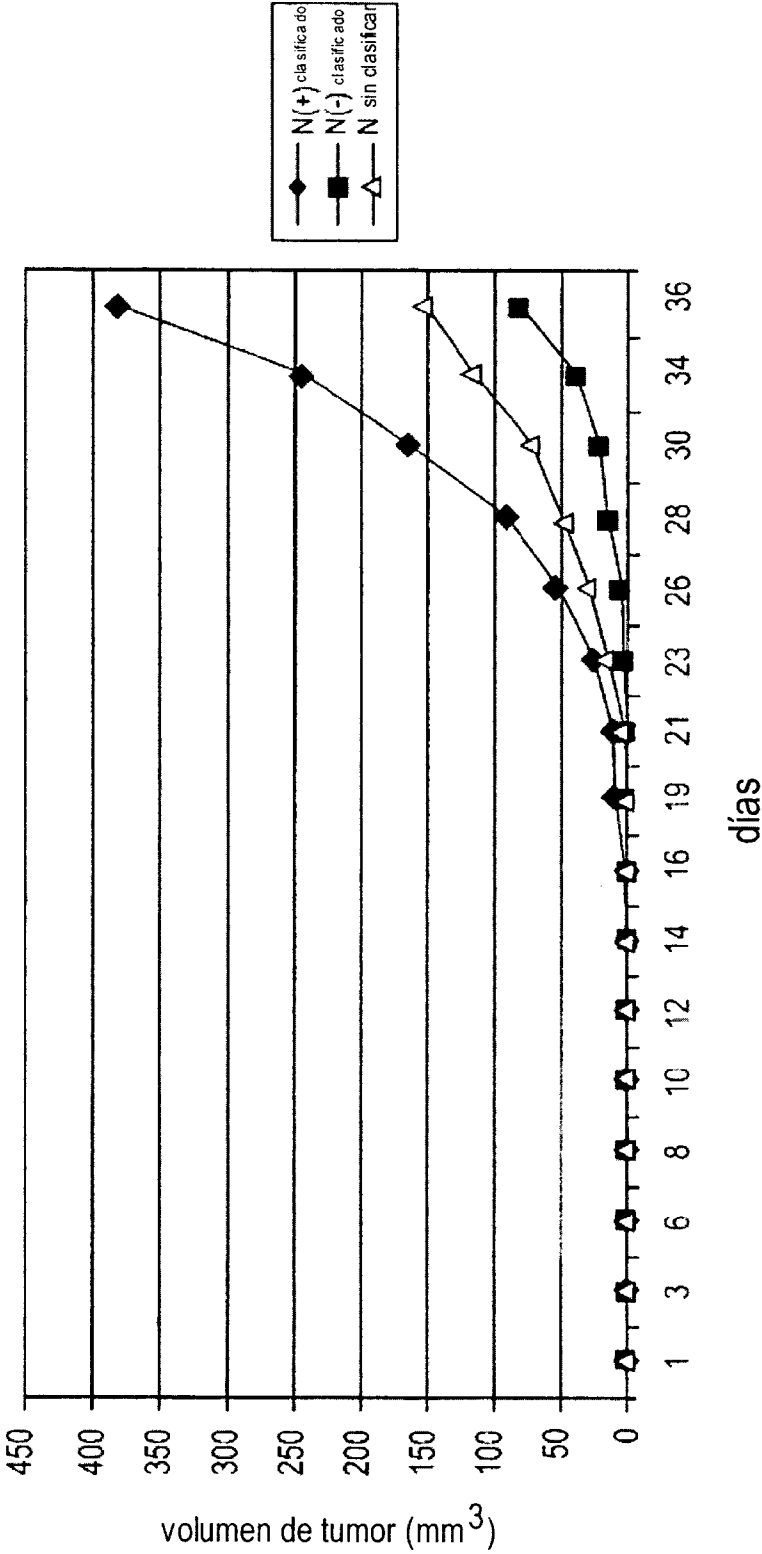


FIG. 20

обсчитано в том же направлении

обсчитано в том же направлении

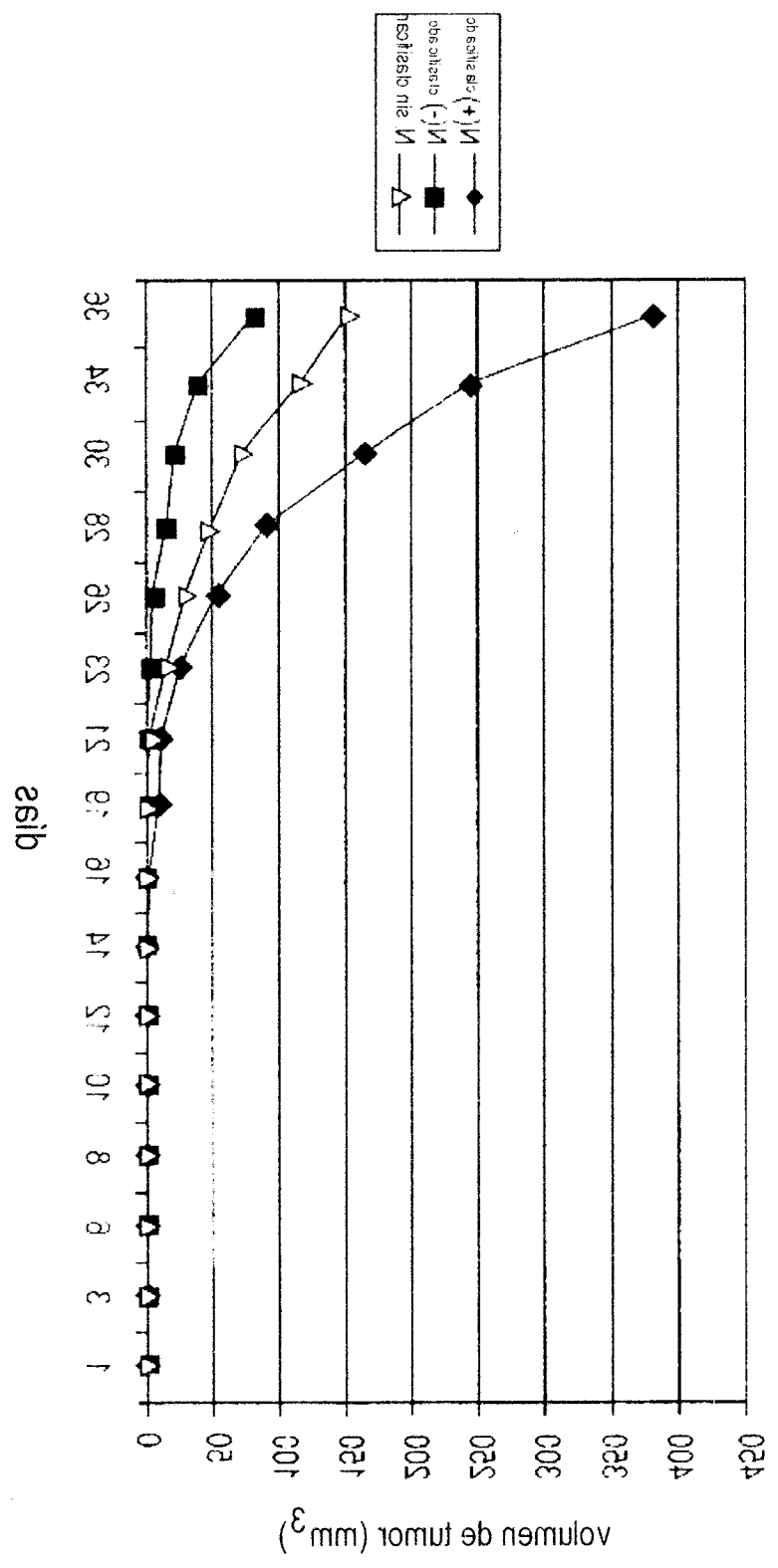
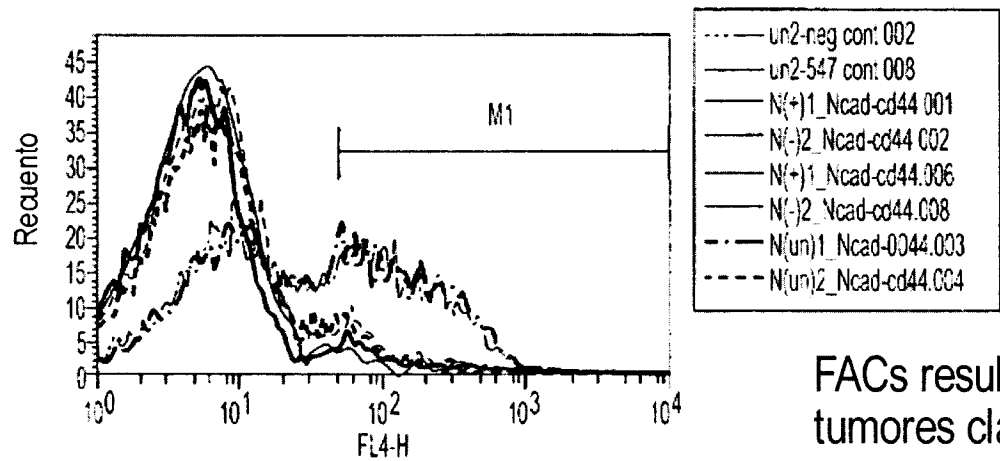


FIG. 20



FACs resulta en
tumores clasificados
N-cad procesados

Nombre de archivo FCS	Parámetro	Marcador	% de células controladas
un2 neg cont.007	FL4-H	Ninguno	100.0
un2 neg cont.007	FL4-H	1	0.18
un2 847 cont.008	FL4-H	Ninguno	100.0
un2-847 cont.008	FL4-H	1	3.32
N(+)-1_Ncap cd44.001	FL4-H	Ninguno	100.0
N(+)-1_Ncad-cd44.001	FL4-H	1	41.72
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	Ninguno	100.0
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	1	40.78
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	Ninguno	100.0
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	1	8.7
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	Ninguno	100.0
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	1	8.46
N(un)-1_Ncad-cd44.003	FL4-H	Ninguno	100.0
N(un)-1_Ncad-cd44.003	FL4-H	1	10.27
N(un)-2_Ncad-cd44.004	FL4-H	Ninguno	100.0
N(un)-2_Ncad-cd44.004	FL4-H	1	8.62

% Promedio

Ncad(+) clasificado 41.25%

Ncad(-) clasificado 8.58%

Ncad sin clasificar 9.95%

FIG. 21

N-cad processados
tumores clasificados
FACS resulta en

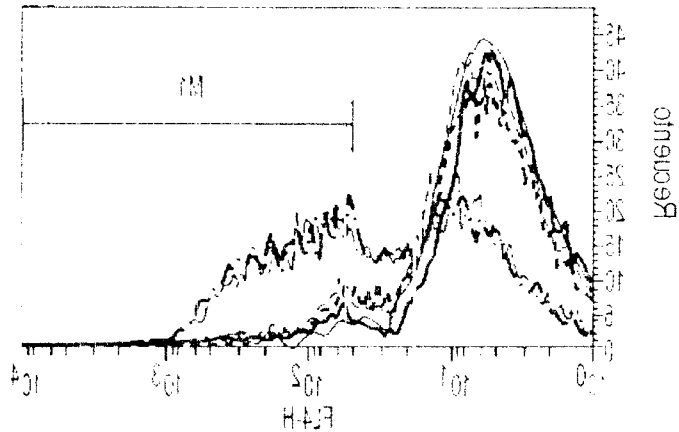
% Promedio

Ncad(+) clasificado 41.25%

Ncad(-) clasificado 8.58%

Ncad sin clasificar 9.95%

Nombre de activo FCS	Parámetro	Marca	% de células controladas
U2 neg cont.007	FL4-H	Ninguno	100.0
U2 neg cont.007	FL4-H	.	0.8
U2 847 cont.008	FL4-H	Ninguno	100.0
U2 847 cont.008	FL4-H	.	3.32
N(+)_Ncad cont.4.001	FL4-H	Ninguno	100.0
N(+)_Ncad cont.4.001	FL4-H	.	4.72
N(+)_Ncad cont.4.002	FL4-H	Ninguno	100.0
N(+)_Ncad cont.4.002	FL4-H	.	48.58
N(-)_Ncad cont.002	FL4-H	Ninguno	100.0
N(-)_Ncad cont.002	FL4-H	.	8.7
N(-)_Ncad cont.003	FL4-H	Ninguno	100.0
N(-)_Ncad cont.003	FL4-H	.	8.46
N(n)_Ncad cont.003	FL4-H	Ninguno	100.0
N(n)_Ncad cont.003	FL4-H	.	10.95
N(n)_Ncad cont.004	FL4-H	Ninguno	100.0
N(n)_Ncad cont.004	FL4-H	.	8.69



U2 neg cont.007
U2 neg cont.007
N(+)_Ncad cont.4.001
N(+)_Ncad cont.4.002
N(+)_Ncad cont.4.002
N(+)_Ncad cont.4.002
N(-)_Ncad cont.002
N(-)_Ncad cont.003
N(n)_Ncad cont.003
N(n)_Ncad cont.004

FIG. 21

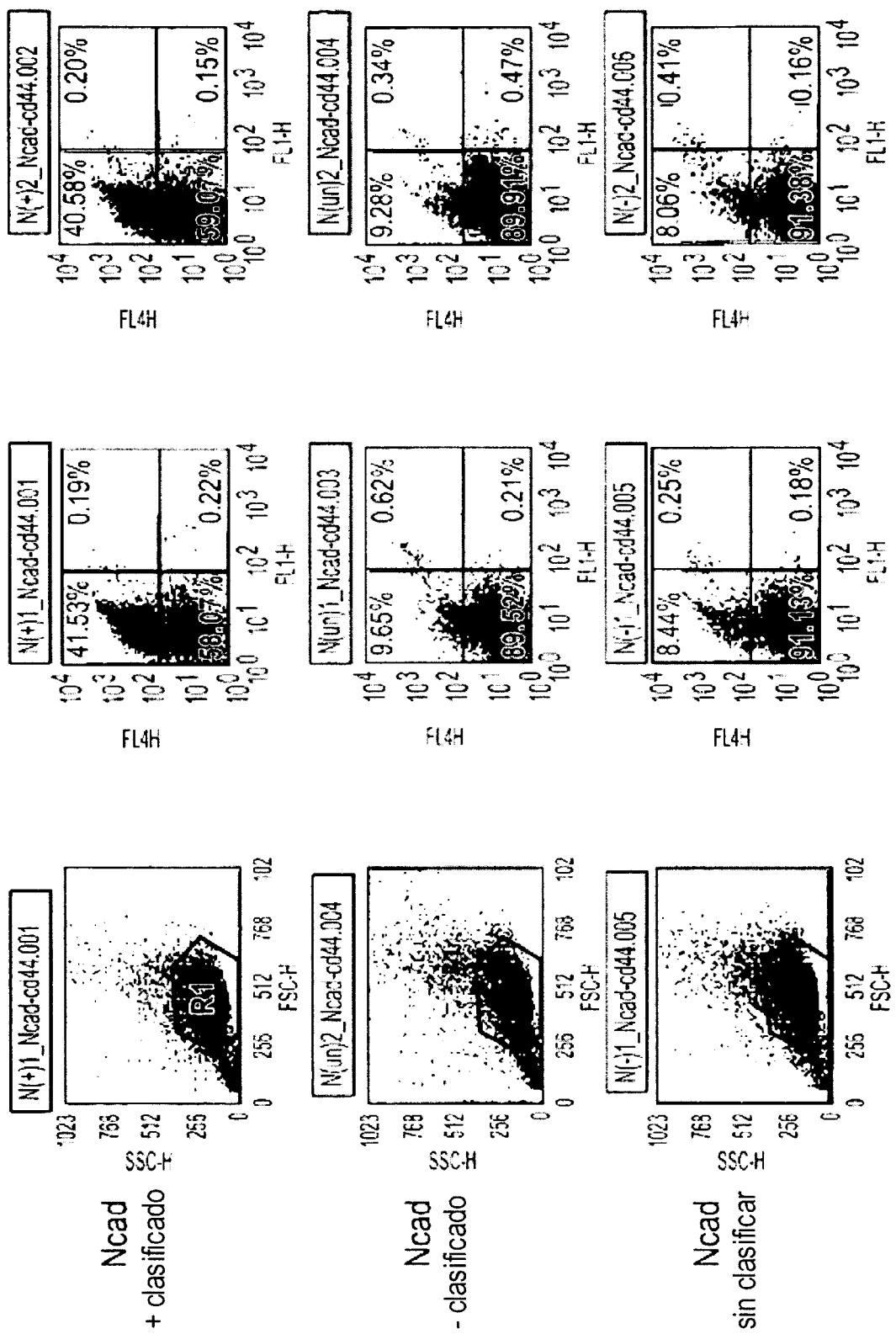
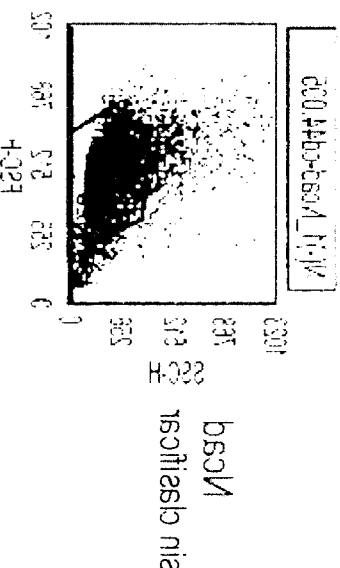
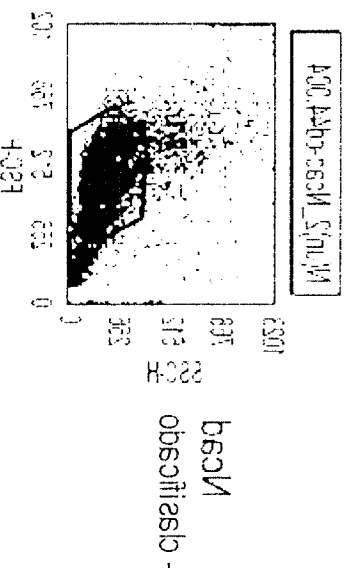
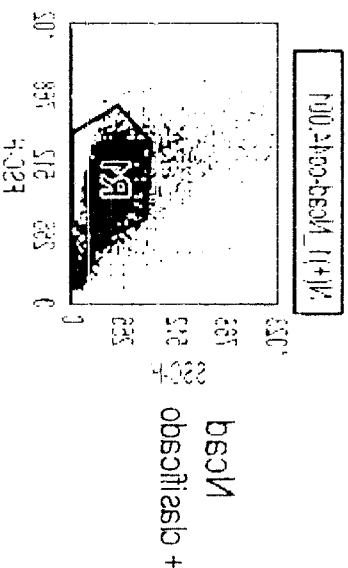
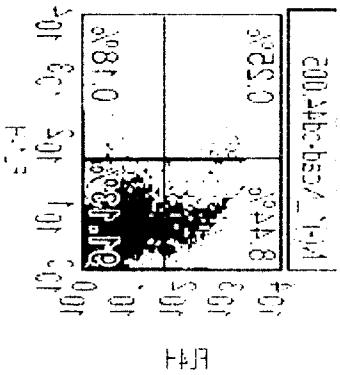
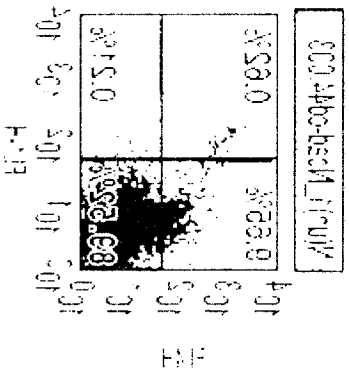
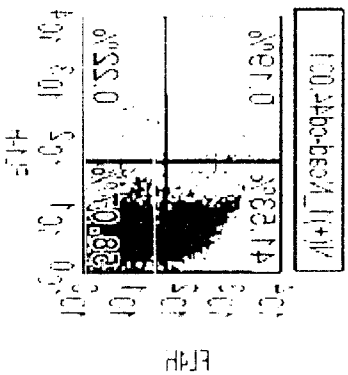
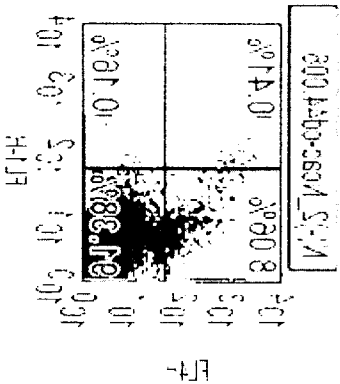
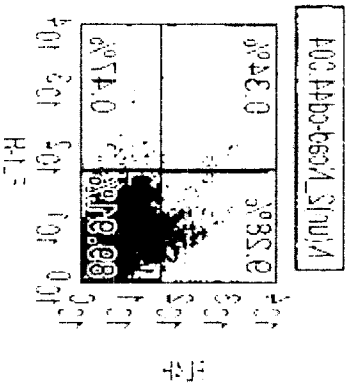
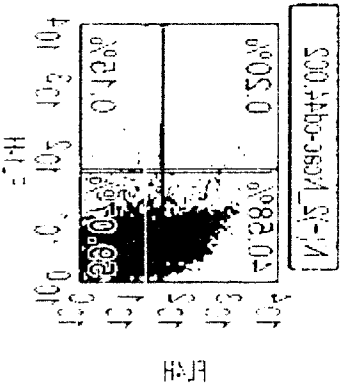


FIG. 22



SS.DIF

Crecimiento de tumores LNCaP-C1 establecidos se inhibe por anticuerpos de N-cadherina

Anticuerpo LNCaP-Nclone1 Ncad establece exp de tumor:
1xPBS vs 1H7 vs EC4 (ajustado)

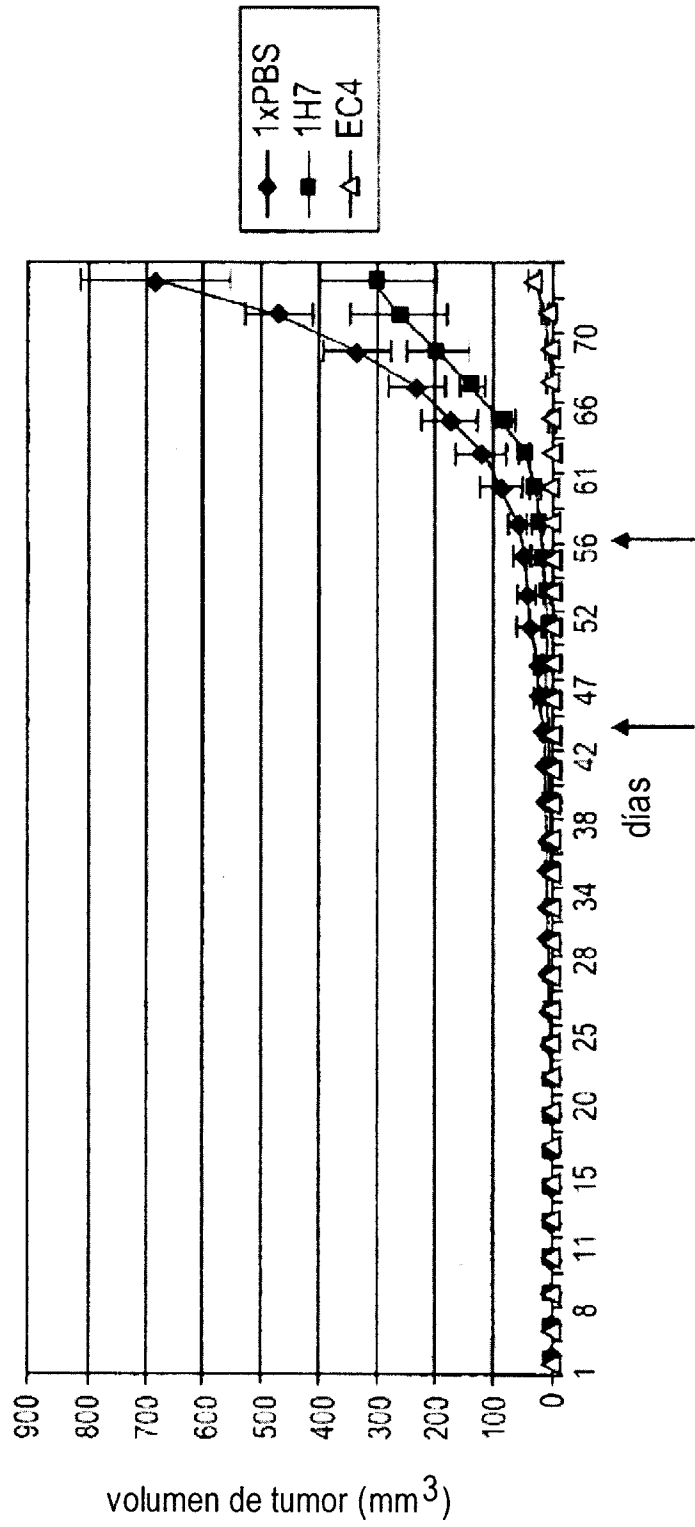
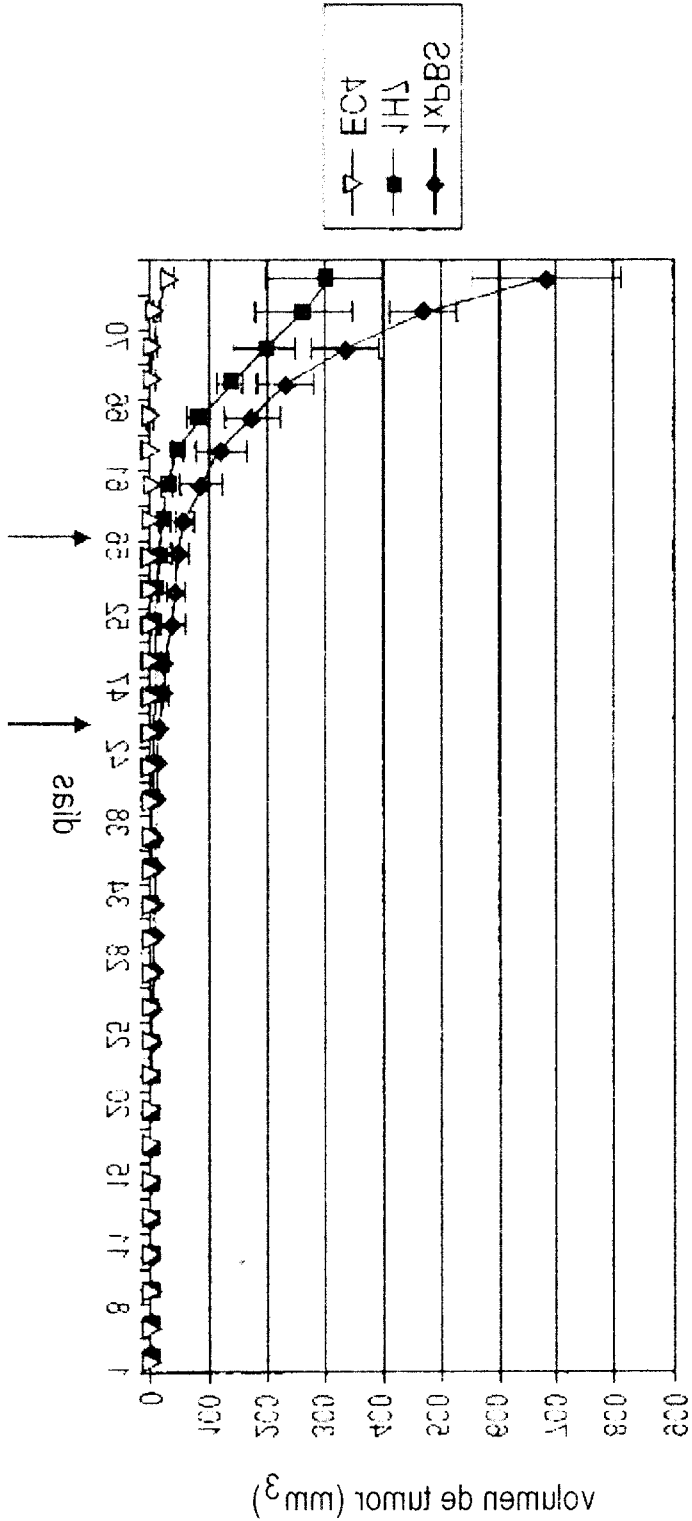


FIG. 23

FIG. 217

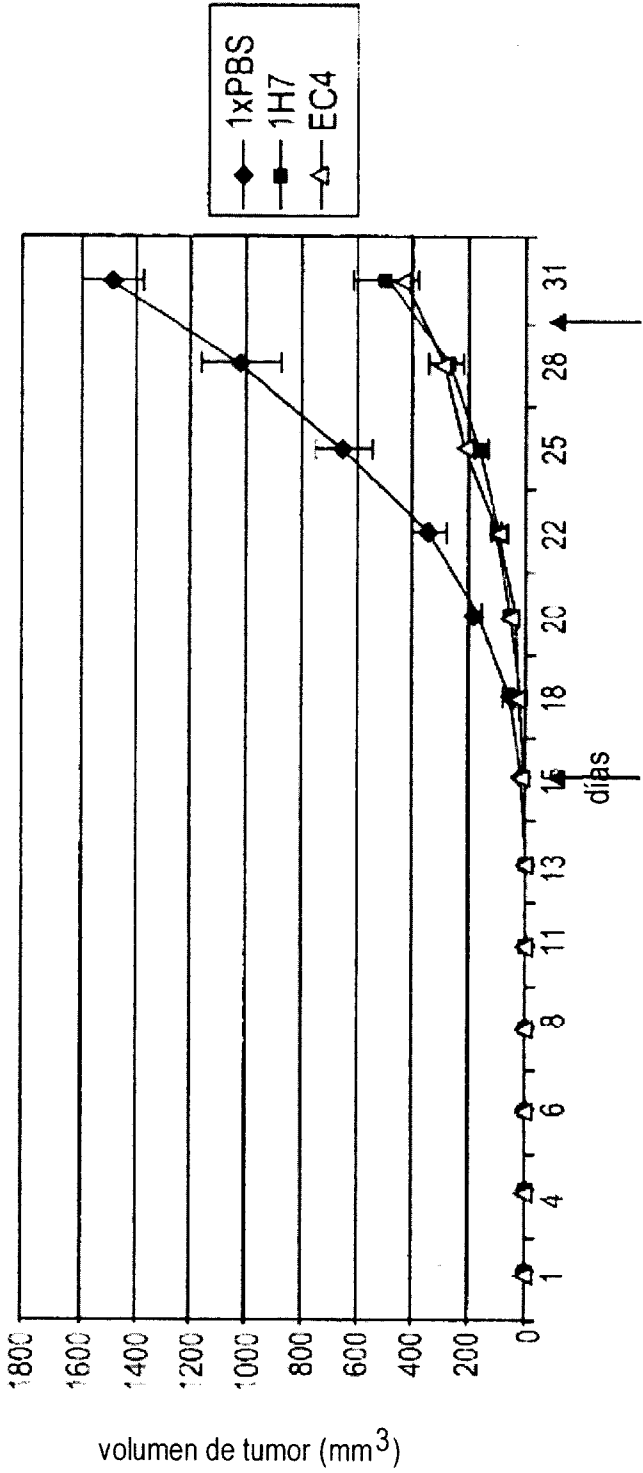


Anticuerpo L1C8H1-9aC11 o que uolunt
AC4 vs TH1 vs EC4 (ajustado)
(obstáculo)

Crecimiento de tumores L1C8H1-9aC11 es inhibido por
anticuerpos de M-cadherina

Anticuerpos de N-cadherina inhiben el crecimiento de tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos (pasaje 7)

LAPC9Al passage7: 1xPBS vs 1H7 vs EC4

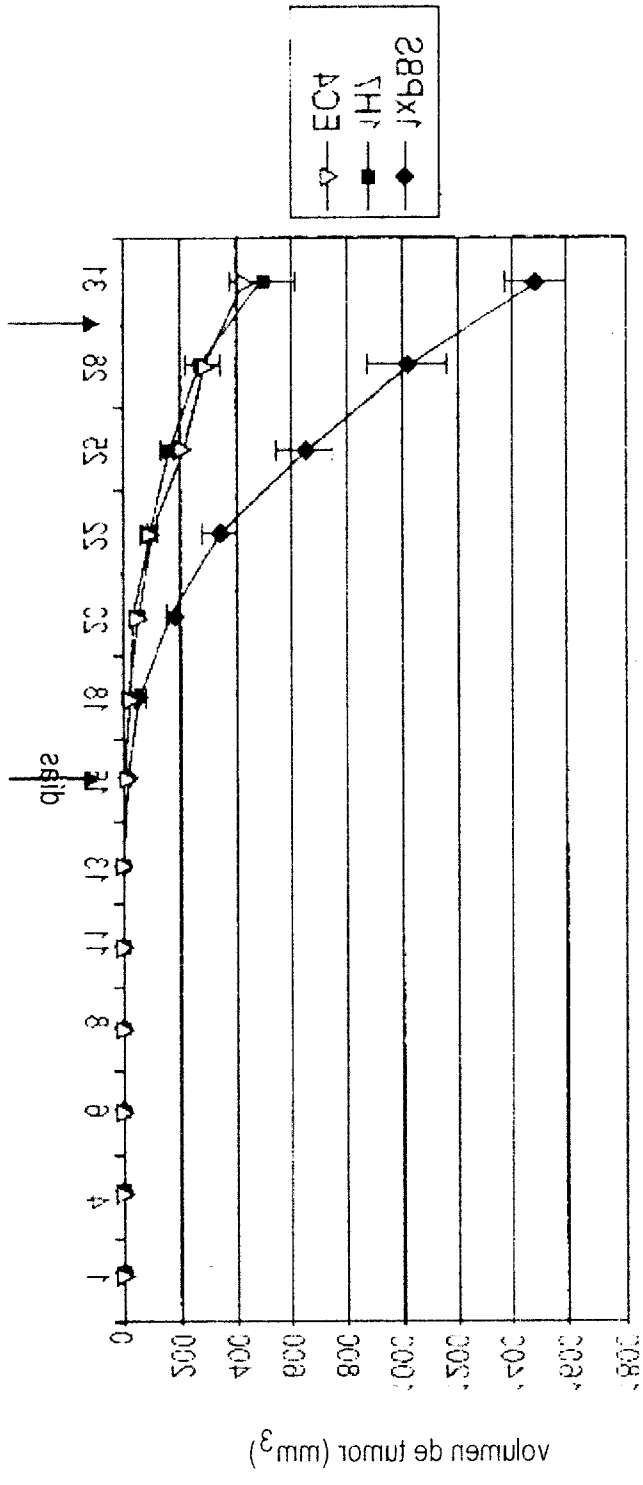


10 mg/kg 2X/semana por dos semanas, inicio día 15

FIG. 24A

Anteriormente se han reportado los casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en el Perú.

AD3 sv TH1 sv 2B9x1 : 79g6226q lAeD9A.J



57/75

A45.317

at sib oicini, asanmes sob roq anames\XS pkl\gm 0r
10 mg/kg

Anticuerpos de N-cadherina inhiben el crecimiento de grandes tumores independientes de andrógeno LAPC-9 establecidos

Experimento de anticuerpo EMTx-1: LAPC9Al p6 1H7 vs inyección posterior EC4

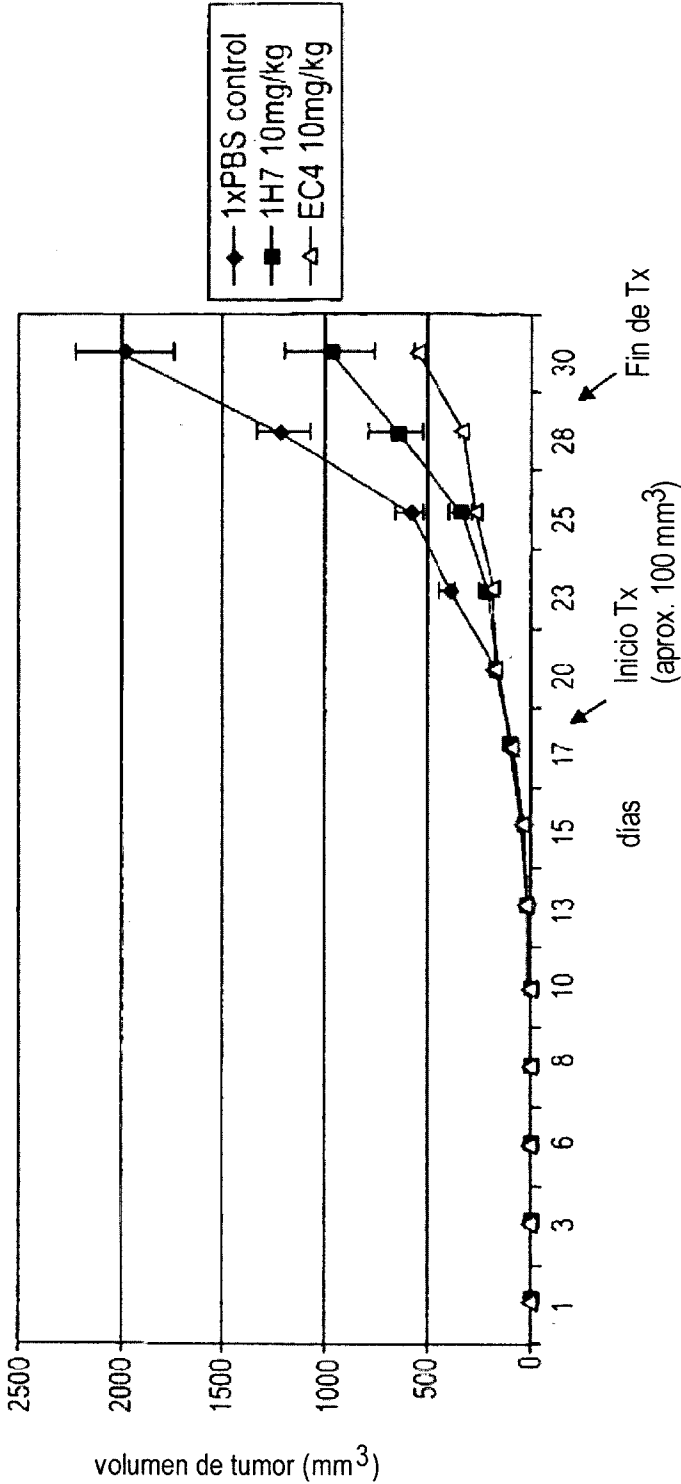


FIG. 24B

Anticancerous activity of 1- α -25(OH) $_2$ D $_3$ in the treatment of breast cancer

Figure 1: Effect of 1- α -25(OH) $_2$ D $_3$ on the growth of breast cancer cells

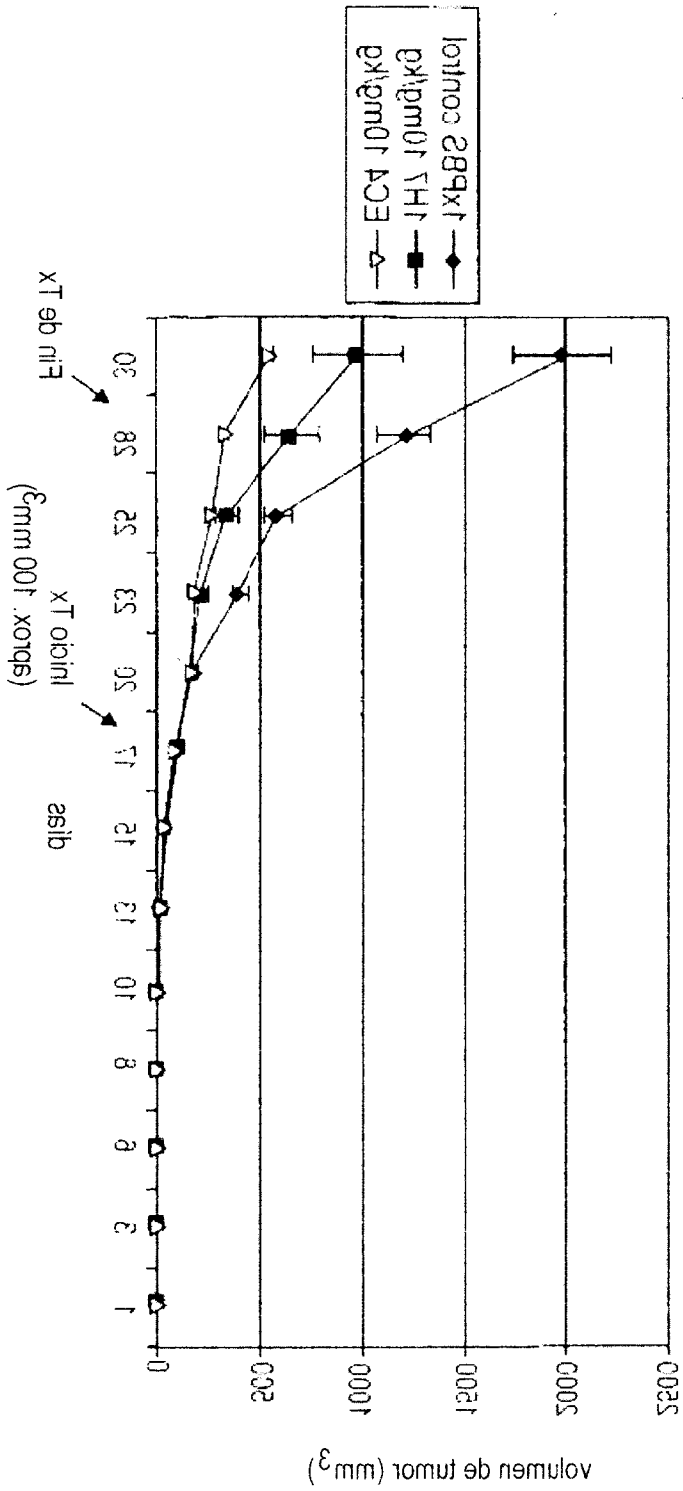


FIG. 54B

Inhibición de Crecimiento Dependiente de Dosis por EC4

Experimento de dosis EC4: PC3 en ratones desnudos

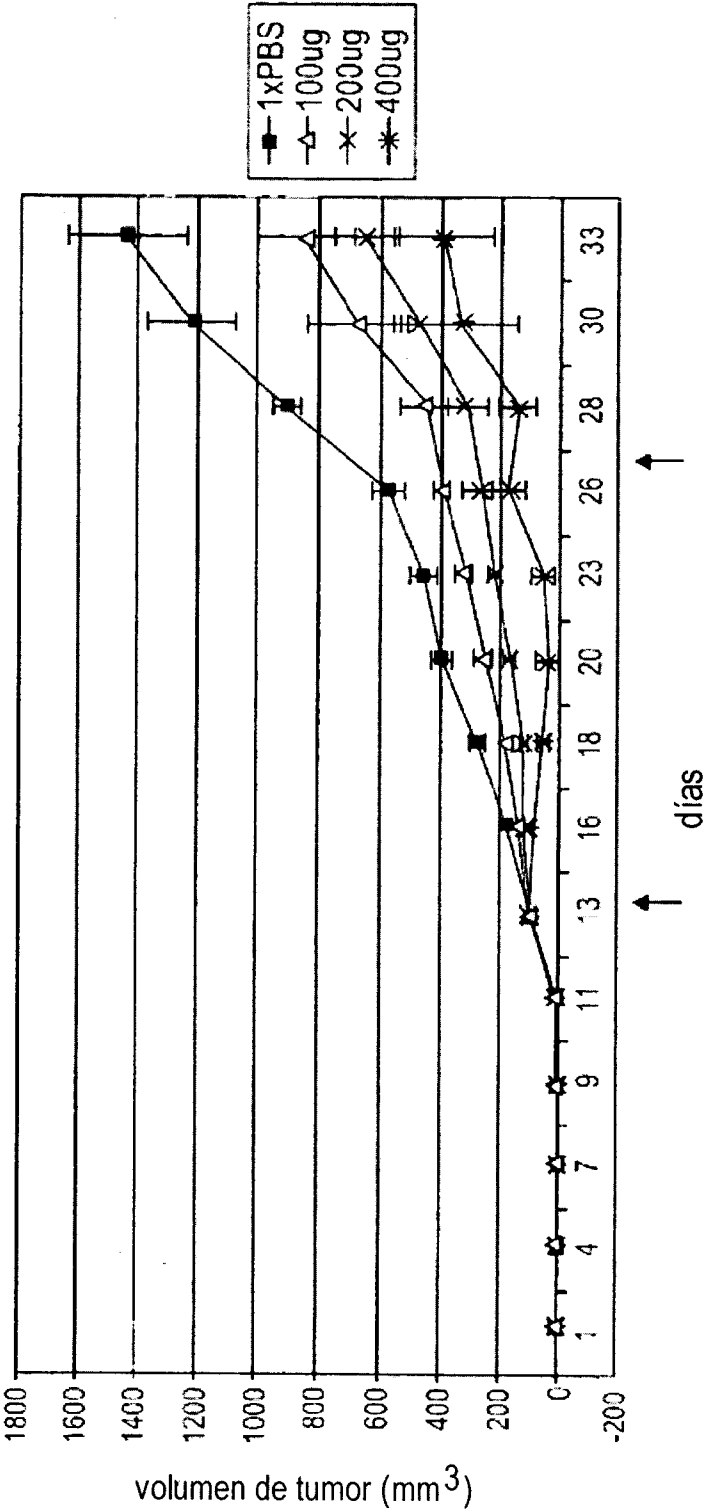
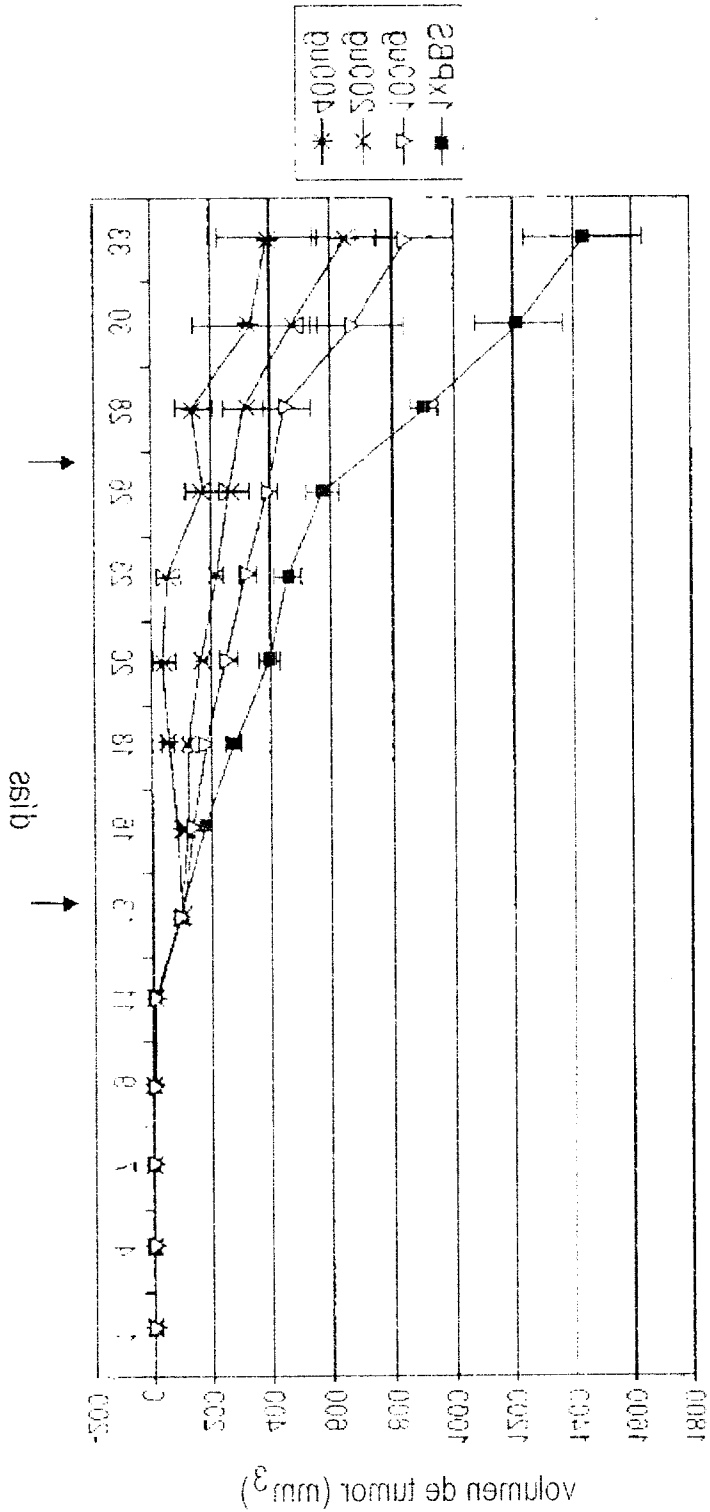


FIG. 25

FIG. 217

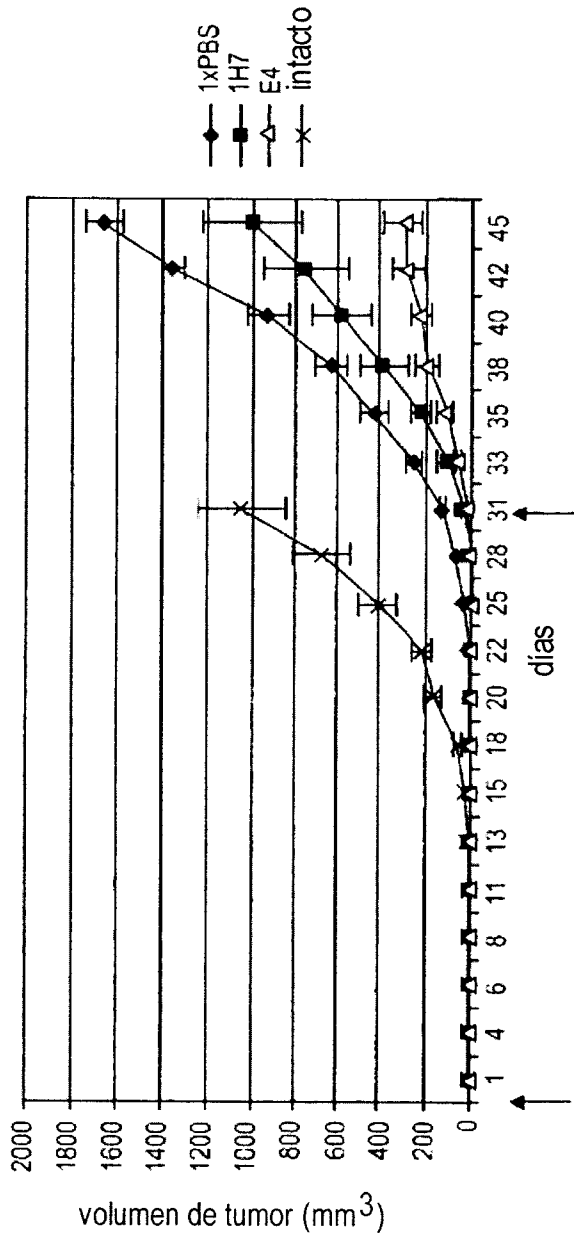


Experimento de dosis EC4: PC3 en ratones desnudos

Inhibición de Crecimiento Dependiente de Dosis por EC4

Anticuerpos de N-cadherina inhiben avance independiente de andrógeno de tumores dependientes de andrógeno LAPC-9

Transición de LAPC9AD a AI: 1xPBS vs 1H7 vs EC4

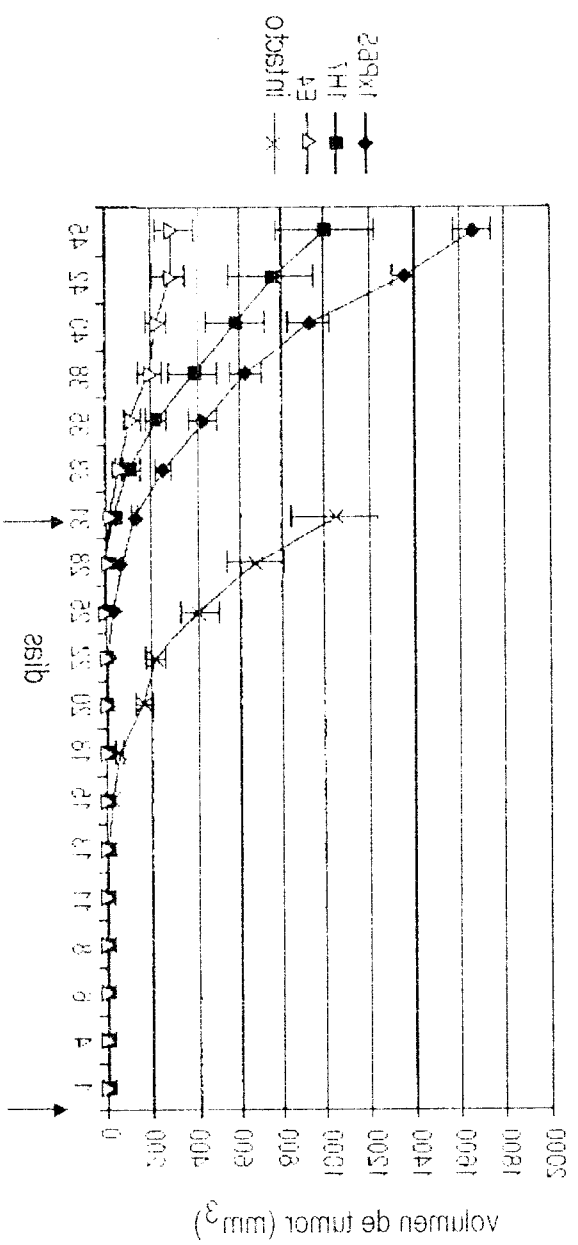


LAPC-9 AD en ratones intactos/LAPC-9 AD en ratones castrados con PBS/1H7/EC4

FIG. 26A

Anteriormente a publicação do Decreto nº 10.000, de 2016, a legislação aplicável ao processo de contratação de bens e serviços era o Decreto nº 7.920, de 2013, que instituiu o Sistema de Registro de Preços (SRP) e o Sistema de Registro de Empresas e Produtos (SREP).

403 av TH↑ av SBQX↑ : JA6 QACQ9AJ ab nòici8nstT



30\33

ADVERTIMENT: Els senyors no solistes senyors no QDA e-QDA

A95. GIF

Anticuerpos de N-cadherina inhiben avance independiente de andrógeno de tumores dependientes de andrógeno LAPC-9

Repetición de Transición de LAPC9AD a AI

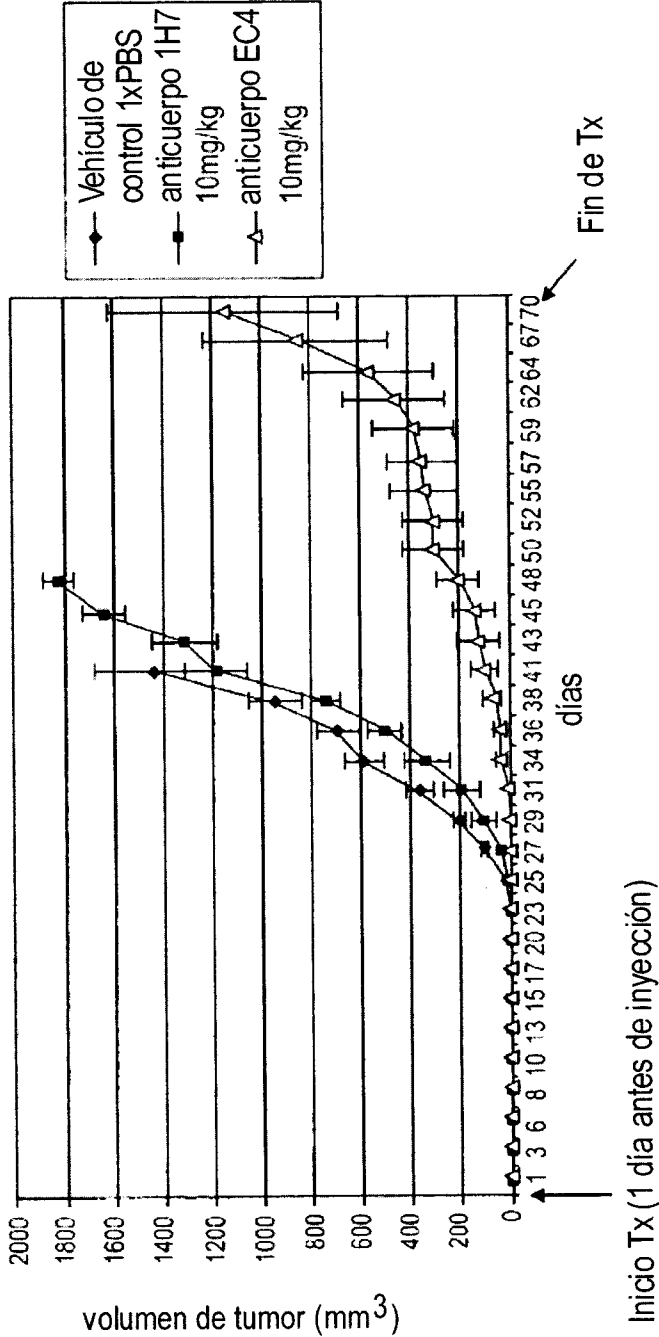


FIG. 26B

de etneibneqebni ecnsvs nediirni snirerhcsa-11 eb soqreucitna
 e-CPAL onegòibns eb setneibneqeb setromut eb onegòibns

IAe DAECPAL eb noiciensT eb noiciieqej

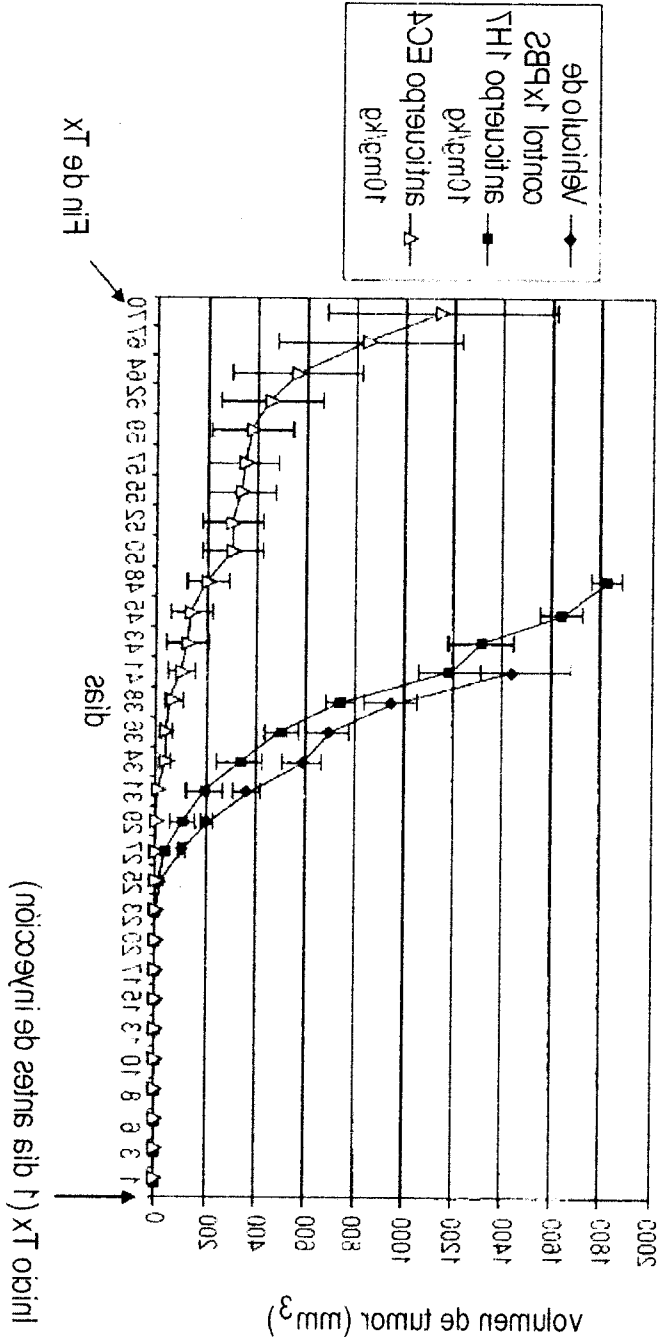


FIG. 2C1F

Células Clasificadas de N-cadherina Tienen Ventaja de Crecimiento en Ratones Castrados

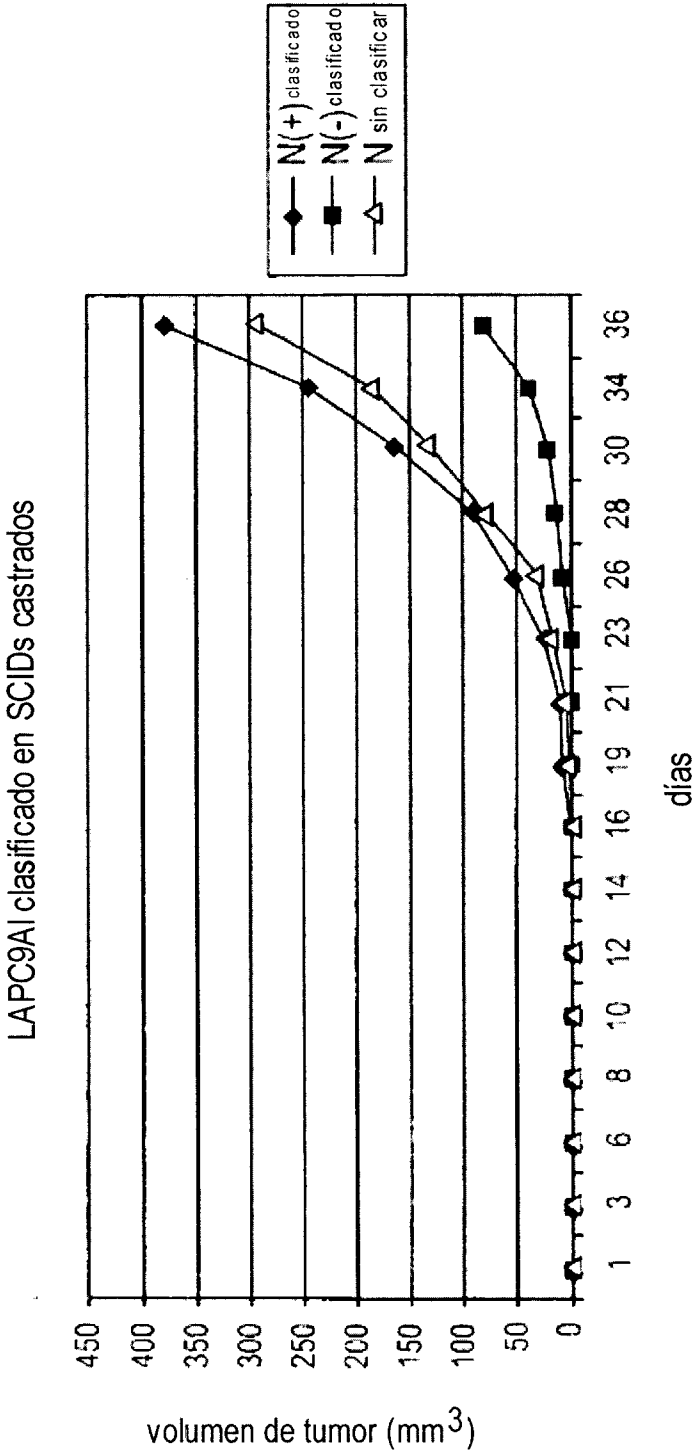
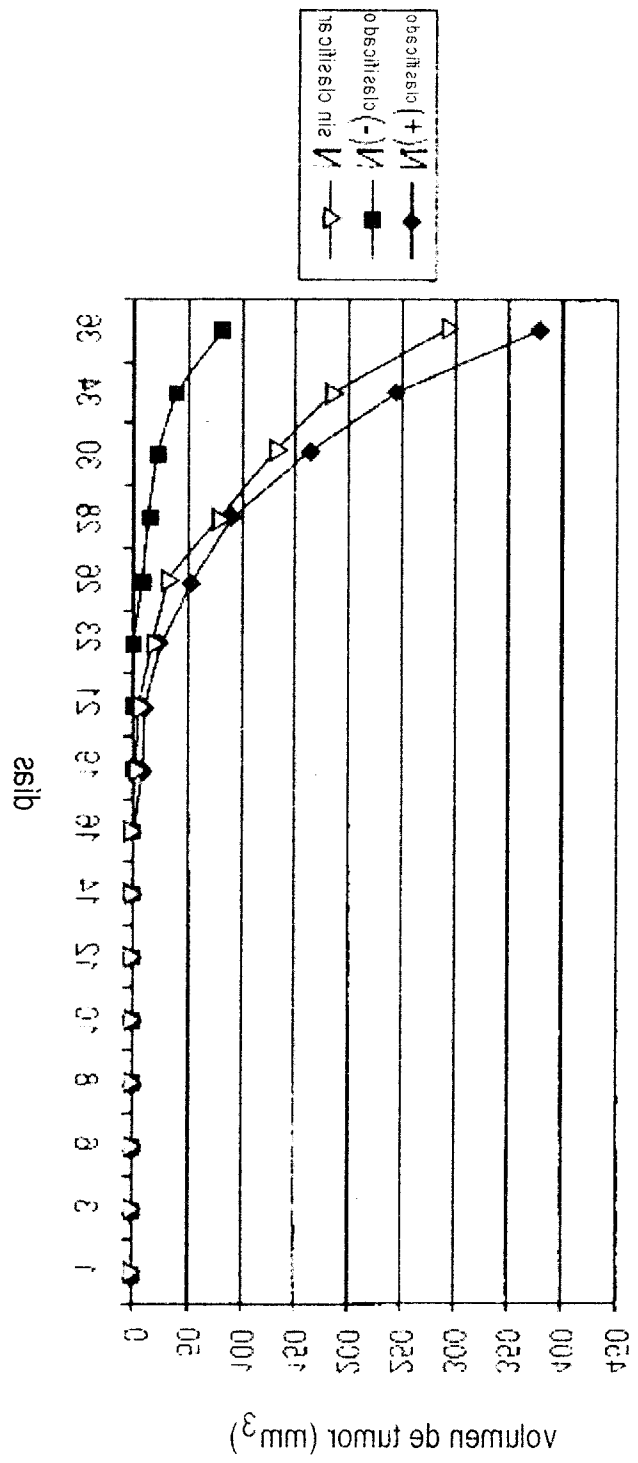


FIG. 27

Células Clásticas Tienen Ventaja de Crecimiento en Ratones Castaños

substrato de CD2 en observación IACCPAL



TS.DIF

Expresión de N-Cadherina Aumenta y AR Disminuye
con Pasos Sucesivos en LAPC9AI

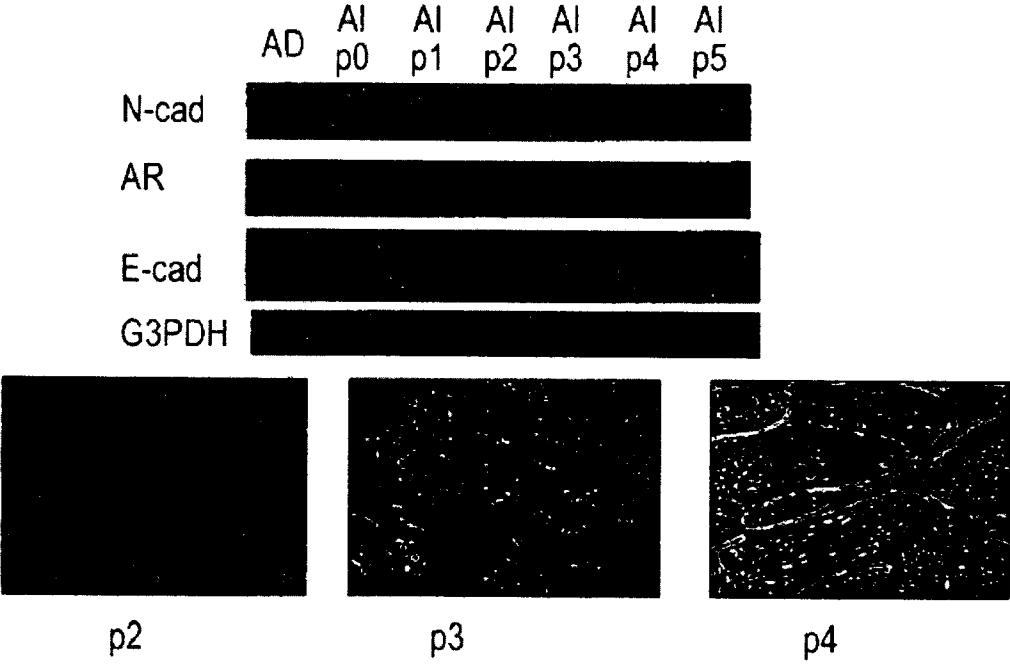


FIG. 28

Expresión de N-Cadherina Aumenta y AR Disminuye
con Pasos Sucesivos en LAPCAI

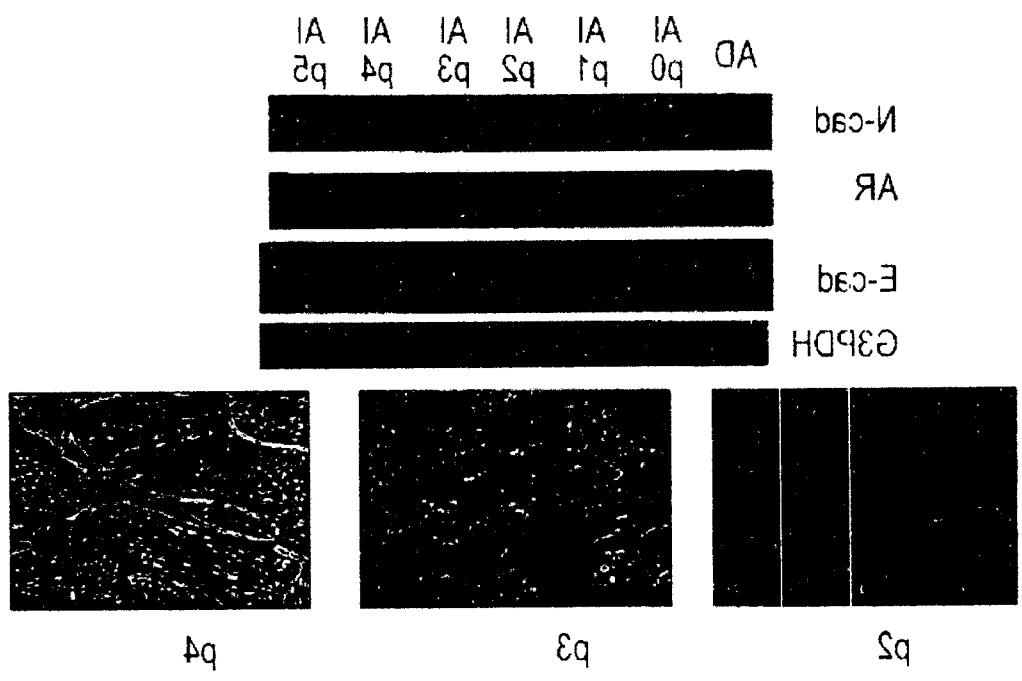


FIG. 28

Modelo de señalización N-cadherina en cáncer de próstata

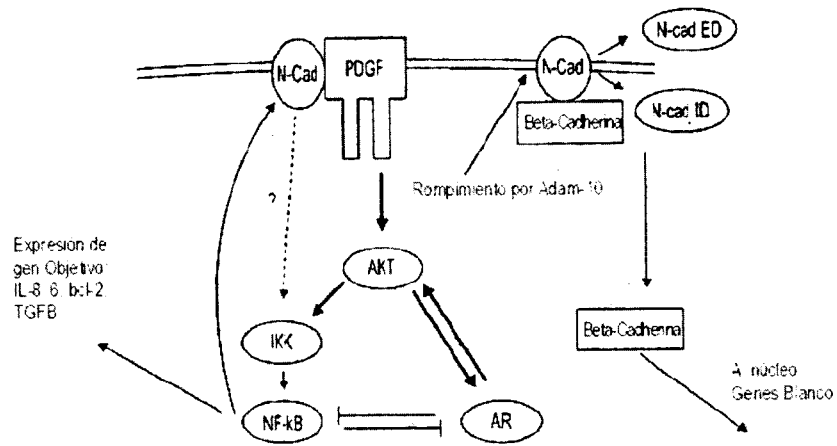


FIG. 1

Modelo de señalización N-cadherina en cáncer de próstata

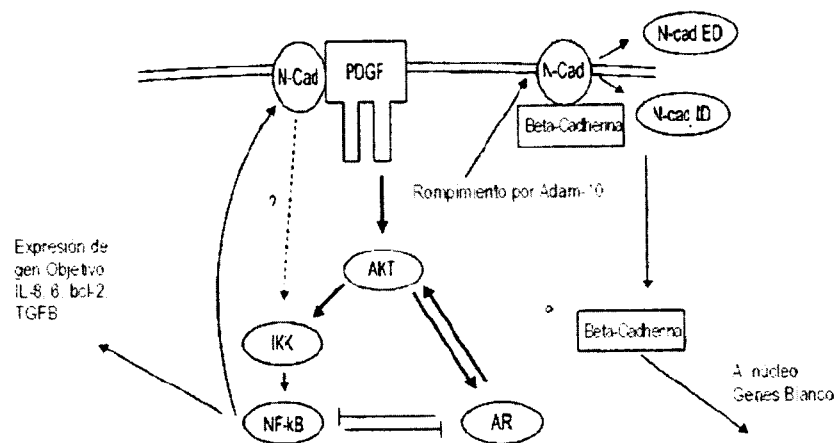


FIG. 1



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **The Regents of The University of California**

(72) Inventor(es) **Robert E. REITER y Zev WAINBERG**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

(32) Fecha

(33) País

ESTADOUNIDENSE
ESTADOUNIDENSE

61/042,604
61/113,054

04/04/2008
10/11/2008

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **08/10/2009**

Fecha de presentación de la solicitud: **03/04/2009**

N° publicación: **WO 2009/124281**

No. de solicitud: **PCT/US2009/039526**

(54) Título: **NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA CÁNCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(31) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(7) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) The Regents of The University of California

(72) Inventor(es) Robert E. REIT y Zev WAINBERG

(74) Agente: HUMBERTO RUBIO CAMACHO

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33) País
ESTADOUNIDENSE		61/042,604		04/04/2008	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		61/113,054		10/11/2008	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 03/04/2009

No. de solicitud: PCT/US2009/039526

(87) Publicación internacional:

Fecha: 08/10/2009

No. de publicación: WO 2009/124281

(54) Título: **NOVEDOSOS ANTICUERPOS CONTRA CÁNCER DIRIGIDOS A BLOQUEO DE CRECIMIENTO DE TUMOR, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS**

Resumen:

Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9387.

Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de la reivindicación 1.

Una línea celular de hibridoma depositada como No. de Acceso ATCC PTA-9388.

Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 4.

Un anticuerpo o su fragmento capaz de ligar a dominios 1-3 de N-cadherina, el mismo determinante antigénico de N-cadherina, in vivo o in vitro, que el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection que tiene No. de Acceso ATCC PTA-9387.

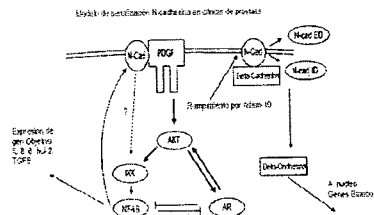


FIG. 1

130

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-136147- -00000-0000

Fecha: 2010-11-03 13:25:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas,establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐