

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

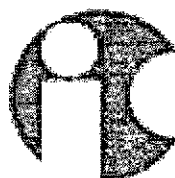
No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTE I/II
Act. 411 PRESENTACION

Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 274

ROYALTIES · PATENTS · TRADEMARKS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

RET
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

11-70978

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO N-CADHERINA: BLANCO PARA DIAGNOSIS Y
TERAPIA DE CÁNCER

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA

DOMICILIO Oakland, California, USA

74. APODERADO CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

22. BOGOTA, D.C. 08 de junio de 2011

Ph. cv
10-06-2011



No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 274Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

ación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1. SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capitulo I☐ Capitulo II

2.

SOLICITANTE
(71)

Nombre:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA

Dirección:

1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, California

Nacionalidad o Domicilio:

Oakland, California 94607-5200, USA

Lugar de Constitución:

Teléfor

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número: _____

3.

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS ORLANDO MAYA
RODRIGUEZDirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2
Bufete 230. Parque Central Bavaria

Teléfor 3419841 Fax: 2435423

E-mail: info@tmtamayo.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número: 17.117.818 TP: 17.402

4.

INVENTOR(ES)
(72)

Nombres: REITER, Robert E.

Dirección: 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, California 90024-6017, USA.

Nacionalidad o Domicilio: 1.- CIUDADANO DE EE.UU.

5. PCT (86)

Solicitud internacional No. PCT/US2009/063921

Fecha: 10-nov-09

Publicación internacional No. WO 2010/054397 A3

Fecha: 14-may-10

6. Título (54)

N-CADHERINA: BLANCO PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA DE CÁNCER

7. Clasificación Internacional (51) AG1K 29/39 - A61 P13/08 - A61P 35/00

8. Prioridad

Si ☒ No ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

10-nov-08

(31) Número de Solicitud

12/268,302

9. Comprobante de pago No.

11-0046947

Fecha

17/05/2011

Solicitud

Comprobante de pago No.

11-0046948

Fecha

17/05/2011

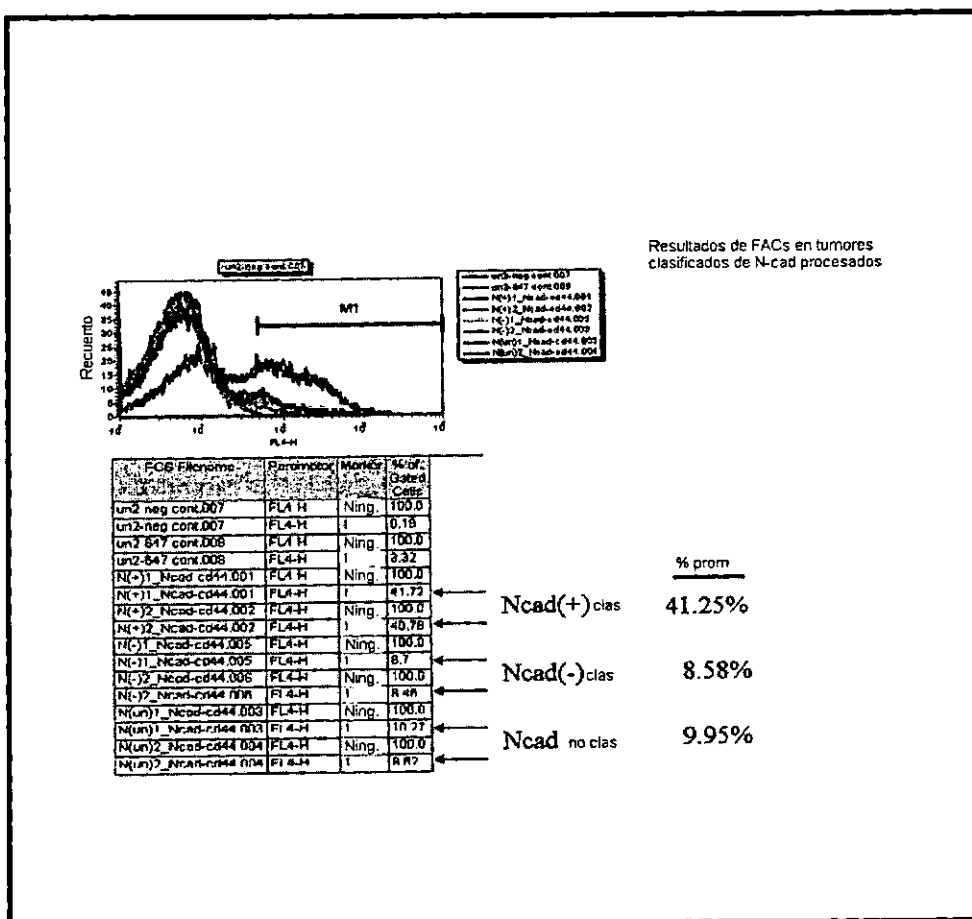
Reivindicaciones Adicionales

10.

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite 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 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
- ☐ 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: PCT/ISA/210, PCT/ISA/220 Y PCT/ISA/237

11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

FIRMA:

C.C. 17.117.818 TP 17.402

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0046947

Bogotá D.C., Mayo 17 de 2011 - 12:21:07

RECIBIDO DE : TM TAMAYO Y ASOCIADOS

NI 830.091.650

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418378041	17/05/2011	1.804.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-070978-00000-0000
 Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-070978-00000-0000
 Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 274

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0046948

Bogotá D.C., Mayo 17 de 2011 - 12:21:07

RECIBIDO DE : TM TAMAYO Y ASOCIADOS

NI 830.091.650

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418378041	17/05/2011	1.804.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
7 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	189.000.00
			\$189.000.00

SON: **CIENTO OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Gaja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 274

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-070978-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 273

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 13/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/063921

(22) International Filing Date:
10 November 2009 (10.11.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
12/268,302 10 November 2008 (10.11.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFOR-

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): REITER, Robert, E. [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, California 90024-6017 (US).

(74) Agents: PARENT, Annette, S. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, Eighth Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,

[Continued on next page]

(54) Title: N-CADHERIN: TARGET FOR CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY

(57) Abstract: The present invention provides methods of diagnosis, providing a prognosis and a therapeutic target for the treatment of cancers that express N-cadherin, including prostate and bladder cancers.

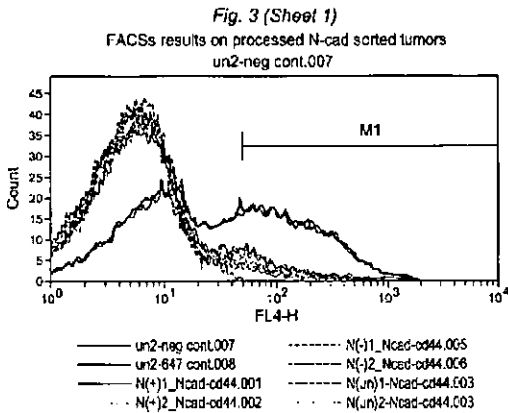


Fig. 3 (Sheet 2)

FCS Filename	Parameter	Marker	% of Gated Cells
un2-neg cont.007	FL4-H	None	100.0
un2-neg cont.007	FL4-H	1	0.19
un2-647 cont.008	FL4-H	None	100.0
un2-647 cont.008	FL4-H	1	3.32
N(+)-1 Ncad cd44.001	FL4-H	None	100.0
N(+)-1 Ncad cd44.001	FL4-H	1	41.72
N(+)-2 Ncad cd44.002	FL4-H	None	100.0
N(+)-2 Ncad cd44.002	FL4-H	1	40.78
N(-)-1 Ncad cd44.005	FL4-H	None	100.0
N(-)-1 Ncad cd44.005	FL4-H	1	8.7
N(-)-2 Ncad cd44.006	FL4-H	None	100.0
N(-)-2 Ncad cd44.006	FL4-H	1	8.46
N(un)-1 Ncad cd44.003	FL4-H	None	100.0
N(un)-1 Ncad cd44.003	FL4-H	1	10.27
N(un)-2 Ncad cd44.004	FL4-H	None	100.0
N(un)-2 Ncad cd44.004	FL4-H	1	9.62

Ave%

Ncad(+)-sort 41.25%

Ncad(-)-sort 8.58%

Ncad unsort 9.95%

KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, SM,

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

(88) **Date of publication of the international search report:**
19 August 2010

N-CADHERIN: TARGET FOR CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

The present application claims priority to USSN 12/268,302, filed November
5 10, 2008, incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

INTRODUCTION

[0001] Prostate cancer is the most common malignancy and the second leading cause of
10 cancer-related death in American men. Prostate cancer is a biologically and clinically
heterogeneous disease. A majority of men with this malignancy harbor slow-growing tumors
that may not impact an individual's natural lifespan, while others are struck by rapidly
progressive, metastatic tumors. PSA screening is limited by a lack of specificity and an
inability to predict which patients are at risk to develop hormone refractory metastatic
15 disease. Recent studies advocating a lower PSA threshold for diagnosis may increase the
number of prostate cancer diagnoses and further complicate the identification of patients with
indolent vs. aggressive cancers (Punglia et al., *N Engl J Med*, 349: 335-342 (2003)). New
serum and tissue markers that correlate with clinical outcome or identify patients with
potentially aggressive disease are urgently needed (Welsh et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*,
20 100: 3410-3415 (2003)).

[0002] Recent expression profiling studies suggest that expression signatures for metastatic
vs. non-metastatic tumors may reside in the primary tumor (Ramaswamy et al., *Nat Genet*,
33: 49-54 (2003); Sotiriou et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10393-10398 (2003)).
Additional features that predispose tumors to metastasize to specific organs may also be
25 present at some frequency in the primary tumor (Kang et al., *Cancer Cell*, 3: 537-549
(2003)). These recent observations suggest that novel markers of pre-metastatic or pre-
hormone refractory prostate cancer may be identified in early stage disease. These markers
may also play a role in the biology of metastatic or hormone refractory prostate cancer
progression. Recent examples of genes present in primary tumors that correlate with
30 outcome and play a role in the biology of prostate cancer progression include EZH2 and LIM

kinase (Varambally et al., *Nature*, 419: 624-629 (2002); Yoshioka et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7247-7252 (2003)). However, neither of these two genes is secreted.

[0003] Here we describe a method of treating or diagnosing a cancer patient, wherein the N-cadherin protein in the cancer cells is expressed at normal or low levels, or is expressed by a subset of cancer cells and is not overexpressed. We also report a method of identifying cancer stem cells by determining the presence or absence or amount of the N-cadherin protein in test tissue sample.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0004] In a first aspect, the present invention provides a method of treating a cancer patient, comprising the steps of: obtaining a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer that expresses a N-cadherin protein; determining the presence or absence or amount of the N-cadherin protein in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for the cancer; thereby diagnosing said cancer that expresses a N-cadherin protein, wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is expressed by a subset of cells, and wherein the N-cadherin protein is not overexpressed; and administering an effective amount of N-cadherin antibody or fragment thereof to the individual at risk of having a cancer that expresses a N-Cadherin protein.

[0005] In another aspect, the present invention provides method of identifying cancer stem cells, comprising the steps of: obtaining a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer that expresses a N-cadherin protein; determining the presence or absence of cancer stem cells in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for the cancer; wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is expressed by a subset of the stem cells and is not overexpressed.

[0006] In one embodiment, said tissue sample is prostate or bladder tissue. In another embodiment, said cancer is a prostate cancer. In another embodiment, said cancer is a bladder cancer. In another embodiment, said cancer is a hormone refractory prostate cancer. In another embodiment, said cancer is a metastatic cancer. In another embodiment, said antibody is a monoclonal antibody. In another embodiment, the fragment is a scFv. In another embodiment, the fragment is a diabody.

[0007] In any of the above aspects and embodiments, the tissue, cancer, subject, or patient to be treated is human or mammalian. In any of the above aspects and embodiments, the cancer can be an androgen independent cancer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- [0008] Figure 1. (a) immunohistochemical staining of an androgen independent LAPC 9 prostate cancer, showing that N-cadherin is only expressed by a small subset of cells (b) treatment of androgen dependent and independent LAPC-9 tumors with control PBS or N-cadherin antibodies 1H7 and EC4.
- [0009] Figure 2. N-cadherin positive and negative cells were sorted, yielding a population of cells that were 100% and 0% positive for N-cadherin, respectively.
- [0010] Figure 3 and 4. FACS analysis of tumors that grew from purely N-cadherin positive and negative cells, vs the control unsorted population.
- 10 [0011] Figures 5 and 6: N-cadherin sequences.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- [0012] We report here on the identification, characterization and validation of a gene product which are expressed in hormone refractory prostate cancer and bladder cancer.
- 15 These gene product is N-Cadherin.
- [0013] N-cadherin does not need to be overexpressed compared to normal tissues to be a target for treatment and diagnosis. It can be expressed at low levels and also can be expressed only by a subset of cells. Data shows that targeting N-cadherin even in 5% of prostate cancer cells is sufficient to block the progression of prostate cancers to castration resistance.
- 20 [0014] N-cadherin is a target in cancer stem cells. The data showing that targeting of N-cadherin in 5% or fewer cells is sufficient to block tumor progression is consistent with the hypothesis that N-cadherin is a marker of cancer stem cells, and that inhibition of N-cadherin on these stem cells is sufficient to block growth of the tumor as a whole.
- [0015] N-cadherin expressing cells, consistent with its being a cancer stem cell marker, are more tumorigenic than N-cadherin non-expressing cells. N-cadherin positive cells can give rise to N-cadherin negative cells, also consistent with the theory that N-cadherin is a novel marker of cancer stem cells. Finally, tumors must upregulate or acquire N-cadherin in order to grow. That is, tumor stem cells must acquire properties of epithelial to mesenchymal transition in order to be tumorigenic.
- 25

[0016] Accordingly, N-Cadherin is an especially promising therapeutic target for cancer therapy, including but not limited to prostate and bladder cancer. It is found on cell surfaces, overexpressed in many epithelial tumors, and is associated with invasion, metastasis and possibly androgen independence. As shown in the present invention cancer stem cells show normal or low expression of N-cadherin. Antibodies against N-cadherin therefore are a particularly preferred agent for use in treating cancers, including but not limited to epithelial, urogenital cancers (bladder, prostate), and, more particularly, their invasive or metastasized forms. In some embodiments, monoclonal antibodies directed against an extracellular domain of N-cadherin are preferred. In further embodiments, the first extracellular domain (EC1), portions of the first and second domains, or fourth extracellular domain of N-cadherin are preferred in treating these cancers. In some embodiments, use of an antibody directed toward the extracellular domain 4 is particularly preferred in these treatments as this domain is found to be important in pro-motility and invasive potential (see, Kim et al, *J Cell Biol.* 151(6):1193-206 (2000), incorporated by reference in its entirety with respect to the definition of the various N-cadherin domains.

[0017] N-cadherin expression can contribute to prostate and bladder cancer invasion and metastasis as well as the progression of prostate cancer to hormone refractory disease. N-Cadherin can be targeted therapeutically both alone and in combination with other small molecule inhibitors of mTOR and EGFR. Targeting N-Cadherin can help prevent or control invasive and metastatic prostate cancer.

Definitions

[0018] "N-Cadherin," refers to nucleic acids, e.g., gene, pre-mRNA, mRNA, and polypeptides, polymorphic variants, alleles, mutants, and interspecies homologs that: (1) have an amino acid sequence that has greater than about 60% amino acid sequence identity, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferably 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% or greater amino acid sequence identity, preferably over a region of over a region of at least about 25, 50, 100, 200, 500, 1000, or more amino acids, to a polypeptide encoded by a respectively referenced nucleic acid or an amino acid sequence described herein, for example, as depicted in Figures 5 and 6, respectively; (2) specifically bind to antibodies, e.g., polyclonal antibodies, raised against an immunogen comprising a referenced amino acid sequence as depicted in Figures 5 and 6, respectively; immunogenic fragments respectively thereof, and conservatively modified variants respectively thereof; (3) specifically hybridize

under stringent hybridization conditions to a nucleic acid encoding a referenced amino acid sequence as depicted in Figures 5 and 6, respectively, and conservatively modified variants respectively thereof; (4) have a nucleic acid sequence that has greater than about 95%, preferably greater than about 96%, 97%, 98%, 99%, or higher nucleotide sequence identity, preferably over a region of at least about 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, or more nucleotides, to a reference nucleic acid sequence as shown, respectively, in Figures 5 and 6. A polynucleotide or polypeptide sequence is typically from a mammal including, but not limited to, primate, e.g., human; rodent, e.g., rat, mouse, hamster; cow, pig, horse, sheep, or any mammal. The nucleic acids and proteins of the invention include both naturally occurring or recombinant molecules.

[0019] "Cancer" refers to human cancers and carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, lymphomas, leukemias, etc., including solid tumors and lymphoid cancers, kidney, breast, lung, kidney, bladder, colon, ovarian, prostate, pancreas, stomach, brain, head and neck, skin, uterine, testicular, esophagus, and liver cancer, lymphoma, including non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma, leukemia, and multiple myeloma. "Urogenital cancer" refers to human cancers of urinary tract and genital tissues, including but not limited to kidney, bladder, urinary tract, urethra, prostate, penis, testicle, vulva, vagina, cervical and ovary tissues.

[0020] The cancer to be treated herein may be one characterized by low or normal expression (but not overexpression) of N-cadherin. In one embodiment of the invention, a diagnostic or prognostic assay will be performed to determine whether the patient's cancer is characterized by low or normal expression of N-cadherin. Various assays for determining such expression are contemplated and include the immunohistochemistry, FISH and shed antigen assays, southern blotting, or PCR techniques. Moreover, the N-cadherin expression or amplification may be evaluated using an *in vivo* diagnostic assay, e.g. by administering a molecule (such as an antibody) which binds the molecule to be detected and is tagged with a detectable label (e.g. a radioactive isotope) and externally scanning the patient for localization of the label. In some embodiments, the cancer or cancer stem cell to be treated is not yet invasive, but expresses N-cadherin.

[0021] "Therapy resistant" cancers, tumor cells, and tumors refers to cancers that have become resistant or refractory to either or both apoptosis-mediated (e.g., through death receptor cell signaling, for example, Fas ligand receptor, TRAIL receptors, TNF-R1, chemotherapeutic drugs, radiation) and non-apoptosis mediated (e.g., toxic drugs, chemicals)

cancer therapies, including chemotherapy, hormonal therapy, radiotherapy, and immunotherapy.

[0022] “Low or normal expression” refers to RNA or protein expression of N-Cadherin, in a test tissue sample that is about the same or lower than RNA or protein expression of N-Cadherin in a control tissue sample. In one embodiment, the tissue sample is autologous.

[0023] The terms “cancer that expresses N-Cadherin” and “cancer associated with the expression of N-Cadherin” interchangeably refer to cancer cells or tissues that express N-Cadherin in accordance with the above definition.

[0024] The terms “cancer-associated antigen” or “tumor-specific marker” or “tumor marker” interchangeably refers to a molecule (typically protein, carbohydrate or lipid) that is preferentially expressed in a cancer cell in comparison to a normal cell, and which is useful for the preferential targeting of a pharmacological agent to the cancer cell. A marker or antigen can be expressed on the cell surface or intracellularly. Oftentimes, a cancer-associated antigen is a molecule that is overexpressed or stabilized with minimal degradation in a cancer cell in comparison to a normal cell, for instance, 2-fold overexpression, 3-fold overexpression or more in comparison to a normal cell. Oftentimes, a cancer-associated antigen is a molecule that is inappropriately synthesized in the cancer cell, for instance, a molecule that contains deletions, additions or mutations in comparison to the molecule expressed on a normal cell. Oftentimes, a cancer-associated antigen will be expressed exclusively in a cancer cell and not synthesized or expressed in a normal cell. Exemplified cell surface tumor markers include the proteins c-erbB-2 and human epidermal growth factor receptor (HER) for breast cancer, PSMA for prostate cancer, and carbohydrate mucins in numerous cancers, including breast, ovarian and colorectal. Exemplified intracellular tumor markers include, for example, mutated tumor suppressor or cell cycle proteins, including p53.

[0025] An “agonist” refers to an agent that binds to a polypeptide or polynucleotide of the invention, stimulates, increases, activates, facilitates, enhances activation, sensitizes or up regulates the activity or expression of a polypeptide or polynucleotide of the invention.

[0026] An “antagonist” refers to an agent that inhibits expression of a polypeptide or polynucleotide of the invention or binds to, partially or totally blocks stimulation, decreases, prevents, delays activation, inactivates, desensitizes, or down regulates the activity of a polypeptide or polynucleotide of the invention.

- 13
- [0027] “Inhibitors,” “activators,” and “modulators” of expression or of activity are used to refer to inhibitory, activating, or modulating molecules, respectively, identified using in vitro and in vivo assays for expression or activity, e.g., ligands, agonists, antagonists, and their homologs and mimetics. The term “modulator” includes inhibitors and activators. Inhibitors are agents that, e.g., inhibit expression of a polypeptide or polynucleotide of the invention or bind to, partially or totally block stimulation or enzymatic activity, decrease, prevent, delay activation, inactivate, desensitize, or down regulate the activity of a polypeptide or polynucleotide of the invention, e.g., antagonists. Activators are agents that, e.g., induce or activate the expression of a polypeptide or polynucleotide of the invention or bind to, stimulate, increase, open, activate, facilitate, enhance activation or enzymatic activity, sensitize or up regulate the activity of a polypeptide or polynucleotide of the invention, e.g., agonists. Modulators include naturally occurring and synthetic ligands, antagonists, agonists, small chemical molecules and the like. Assays to identify inhibitors and activators include, e.g., applying putative modulator compounds to cells, in the presence or absence of a polypeptide or polynucleotide of the invention and then determining the functional effects on a polypeptide or polynucleotide of the invention activity. Samples or assays comprising a polypeptide or polynucleotide of the invention that are treated with a potential activator, inhibitor, or modulator are compared to control samples without the inhibitor, activator, or modulator to examine the extent of effect. Control samples (untreated with modulators) are assigned a relative activity value of 100%. Inhibition is achieved when the activity value of a polypeptide or polynucleotide of the invention relative to the control is about 80%, optionally 50% or 25-1%. Activation is achieved when the activity value of a polypeptide or polynucleotide of the invention relative to the control is 110%, optionally 150%, optionally 200-500%, or 1000-3000% higher.
- [0028] The term “test compound” or “drug candidate” or “modulator” or grammatical equivalents as used herein describes any molecule, either naturally occurring or synthetic, e.g., protein, oligopeptide (e.g., from about 5 to about 25 amino acids in length, preferably from about 10 to 20 or 12 to 18 amino acids in length, preferably 12, 15, or 18 amino acids in length), small organic molecule, polysaccharide, lipid, fatty acid, polynucleotide, RNAi, siRNA, antibody, oligonucleotide, etc. The test compound can be in the form of a library of test compounds, such as a combinatorial or randomized library that provides a sufficient range of diversity. Test compounds are optionally linked to a fusion partner, e.g., targeting compounds, rescue compounds, dimerization compounds, stabilizing compounds,

addressable compounds, and other functional moieties. Conventionally, new chemical entities with useful properties are generated by identifying a test compound (called a "lead compound") with some desirable property or activity, e.g., inhibiting activity, creating variants of the lead compound, and evaluating the property and activity of those variant compounds. Often, high throughput screening (HTS) methods are employed for such an analysis.

[0029] A "small organic molecule" refers to an organic molecule, either naturally occurring or synthetic, that has a molecular weight of more than about 50 Daltons and less than about 2500 Daltons, preferably less than about 2000 Daltons, preferably between about 100 to about 1000 Daltons, more preferably between about 200 to about 500 Daltons.

[0030] Cytotoxic agents include "cell-cycle-specific" or "antimitotic" or "cytoskeletal-interacting" drugs. These terms interchangeably refer to any pharmacological agent that blocks cells in mitosis. Such agents are useful in chemotherapy. Generally, cell-cycle-specific-drugs bind to the cytoskeletal protein tubulin and block the ability of tubulin to polymerize into microtubules, resulting in the arrest of cell division at metaphase. Exemplified cell-cycle-specific drugs include vinca alkaloids, taxanes, colchicine, and podophyllotoxin. Exemplified vinca alkaloids include vinblastine, vincristine, vindesine and vinorelbine. Exemplified taxanes include paclitaxel and docetaxel. Another example of a cytoskeletal-interacting drug includes 2-methoxyestradiol.

[0031] An "siRNA" or "RNAi" refers to a nucleic acid that forms a double stranded RNA, which double stranded RNA has the ability to reduce or inhibit expression of a gene or target gene when the siRNA expressed in the same cell as the gene or target gene. "siRNA" or "RNAi" thus refers to the double stranded RNA formed by the complementary strands. The complementary portions of the siRNA that hybridize to form the double stranded molecule typically have substantial or complete identity. In one embodiment, an siRNA refers to a nucleic acid that has substantial or complete identity to a target gene and forms a double stranded siRNA. Typically, the siRNA is at least about 15-50 nucleotides in length (e.g., each complementary sequence of the double stranded siRNA is 15-50 nucleotides in length, and the double stranded siRNA is about 15-50 base pairs in length, preferable about preferably about 20-30 base nucleotides, preferably about 20-25 or about 24-29 nucleotides in length, e.g., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30 nucleotides in length.

[0032] The design and making of siRNA molecules and vectors are well known to those of ordinary skill in the art. For instance, an efficient process for designing a suitable siRNA is

to start at the AUG start codon of the mRNA transcript and scan for AA dinucleotide sequences (see, Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888 (2001). Each AA and the 3' adjacent nucleotides are potential siRNA target sites. The length of the adjacent site sequence will determine the length of the siRNA. For instance, 19 adjacent sites would give a 21

- 5 Nucleotide long siRNA siRNAs with 3' overhanging UU dinucleotides are often the most effective. This approach is also compatible with using RNA pol III to transcribe hairpin siRNAs. RNA pol III terminates transcription at 4-6 nucleotide poly(T) tracts to create RNA molecules having a short poly(U) tail. However, siRNAs with other 3' terminal dinucleotide overhangs can also effectively induce RNAi and the sequence may be empirically selected.
- 10 For selectivity, target sequences with more than 16-17 contiguous base pairs of homology to other coding sequences can be avoided by conducting a BLAST search (*see*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

- [0033] The siRNA can be administered directly or an siRNA expression vectors can be used to induce RNAi can have different design criteria. A vector can have inserted two
- 15 inverted repeats separated by a short spacer sequence and ending with a string of T's which serve to terminate transcription. The expressed RNA transcript is predicted to fold into a short hairpin siRNA. The selection of siRNA target sequence, the length of the inverted repeats that encode the stem of a putative hairpin, the order of the inverted repeats, the length and composition of the spacer sequence that encodes the loop of the hairpin, and the presence
- 20 or absence of 5'-overhangs, can vary. A preferred order of the siRNA expression cassette is sense strand, short spacer, and antisense strand. Hairpin siRNAs with these various stem lengths (e.g., 15 to 30) can be suitable. The length of the loops linking sense and antisense strands of the hairpin siRNA can have varying lengths (e.g., 3 to 9 nucleotides, or longer). The vectors may contain promoters and expression enhancers or other regulatory elements
- 25 which are operably linked to the nucleotide sequence encoding the siRNA. The expression "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation
- 30 signals, and enhancers. These control elements may be designed to allow the clinician to turn off or on the expression of the gene by adding or controlling external factors to which the regulatory elements are responsive.

[0034] Construction of suitable vectors containing the desired therapeutic gene coding and control sequences employs standard ligation and restriction techniques, which are well understood in the art (see Maniatis et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)). Isolated plasmids, DNA sequences, or
5 synthesized oligonucleotides are cleaved, tailored, and re-ligated in the form desired.

[0035] Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding
10 sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are near each other, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such
15 sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

[0036] "Determining the functional effect" refers to assaying for a compound that increases or decreases a parameter that is indirectly or directly under the influence of a polynucleotide or polypeptide of the invention, e.g., measuring physical and chemical or
20 phenotypic effects. Such functional effects can be measured by any means known to those skilled in the art, e.g., changes in spectroscopic (e.g., fluorescence, absorbance, refractive index), hydrodynamic (e.g., shape), chromatographic, or solubility properties for the protein; measuring inducible markers or transcriptional activation of the protein; measuring binding activity or binding assays, e.g. binding to antibodies; measuring changes in ligand binding
25 affinity; measurement of calcium influx; measurement of the accumulation of an enzymatic product of a polypeptide of the invention or depletion of an substrate; changes in enzymatic activity, e.g., kinase activity, measurement of changes in protein levels of a polypeptide of the invention; measurement of RNA stability; G-protein binding; GPCR phosphorylation or dephosphorylation; signal transduction, e.g., receptor-ligand interactions, second messenger
30 concentrations (e.g., cAMP, IP3, or intracellular Ca²⁺); identification of downstream or reporter gene expression (CAT, luciferase, β -gal, GFP and the like), e.g., via

chemiluminescence, fluorescence, colorimetric reactions, antibody binding, inducible markers, and ligand binding assays.

[0037] Samples or assays comprising a nucleic acid or protein disclosed herein that are treated with a potential activator, inhibitor, or modulator are compared to control samples without the inhibitor, activator, or modulator to examine the extent of inhibition. Control samples (untreated with inhibitors) are assigned a relative protein activity value of 100%. Inhibition is achieved when the activity value relative to the control is about 80%, preferably 50%, more preferably 25-0%. Activation is achieved when the activity value relative to the control (untreated with activators) is 110%, more preferably 150%, more preferably 200-500% (i.e., two to five fold higher relative to the control), more preferably 1000-3000% higher.

[0038] "Biological sample" includes sections of tissues such as biopsy and autopsy samples, and frozen sections taken for histological purposes. Such samples include blood and blood fractions or products (e.g., serum, plasma, platelets, red blood cells, and the like), sputum, tissue, cultured cells, e.g., primary cultures, explants, and transformed cells, stool, urine, etc. A biological sample is typically obtained from a eukaryotic organism, most preferably a mammal such as a primate e.g., chimpanzee or human; cow; dog; cat; a rodent, e.g., guinea pig, rat, Mouse; rabbit; or a bird; reptile; or fish.

[0039] A "biopsy" refers to the process of removing a tissue sample for diagnostic or prognostic evaluation, and to the tissue specimen itself. Any biopsy technique known in the art can be applied to the diagnostic and prognostic methods of the present invention. The biopsy technique applied will depend on the tissue type to be evaluated (i.e., prostate, lymph node, liver, bone marrow, blood cell), the size and type of the tumor (i.e., solid or suspended (i.e., blood or ascites)), among other factors. Representative biopsy techniques include excisional biopsy, incisional biopsy, needle biopsy, surgical biopsy, and bone marrow biopsy. An "excisional biopsy" refers to the removal of an entire tumor mass with a small margin of normal tissue surrounding it. An "incisional biopsy" refers to the removal of a wedge of tissue that includes a cross-sectional diameter of the tumor. A diagnosis or prognosis made by endoscopy or fluoroscopy can require a "core-needle biopsy" of the tumor mass, or a "fine-needle aspiration biopsy" which generally obtains a suspension of cells from within the tumor mass. Biopsy techniques are discussed, for example, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper, *et al.*, eds., 16th ed., 2005, Chapter 70, and throughout Part V.

[0040] The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (i.e., about 60% identity, preferably 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 5 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or higher identity over a specified region, when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window or designated region) as measured using a BLAST or BLAST 2.0 sequence comparison algorithms with default parameters described below, or by manual alignment and visual inspection (*see, e.g.*, NCBI web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> or the like). Such sequences are then said to 10 be "substantially identical." This definition also refers to, or may be applied to, the complement of a test sequence. The definition also includes sequences that have deletions and/or additions, as well as those that have substitutions. As described below, the preferred algorithms can account for gaps and the like. Preferably, identity exists over a region that is at least about 25 amino acids or nucleotides in length, or more preferably over a region that is 15 50-100 amino acids or nucleotides in length.

[0041] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Preferably, default 20 program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

[0042] A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, 25 usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences for comparison are well-known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), 30 by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer

Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (*see, e.g., Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 supplement)).

- [0043] A preferred example of algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are
- 5 described in Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) and Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectively. BLAST and BLAST 2.0 are used, with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the nucleic acids and proteins of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 10 This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs
- 15 containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the
- 20 word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences)
- 25 uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (*see* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.
- 30 [0044] "Nucleic acid" refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form, and complements thereof. The term encompasses nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring,

which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

5 [0045] Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g., degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or
10 deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, *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)). The term nucleic acid is used interchangeably with gene, cDNA, mRNA, oligonucleotide, and polynucleotide.

[0046] A particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses "splice variants." 15 Similarly, a particular protein encoded by a nucleic acid implicitly encompasses any protein encoded by a splice variant of that nucleic acid. "Splice variants," as the name suggests, are products of alternative splicing of a gene. After transcription, an initial nucleic acid transcript may be spliced such that different (alternate) nucleic acid splice products encode different polypeptides. Mechanisms for the production of splice variants vary, but include alternate
20 splicing of exons. Alternate polypeptides derived from the same nucleic acid by read-through transcription are also encompassed by this definition. Any products of a splicing reaction, including recombinant forms of the splice products, are included in this definition. An example of potassium channel splice variants is discussed in Leicher, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273(52):35095-35101 (1998).

25 [0047] The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer.

30 [0048] The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the

genetic code, as well as those amino acids that are later modified, e.g., hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, i.e., an α carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, e.g., homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

10 [0049] Amino acids may be referred to herein by either their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Nucleotides, likewise, may be referred to by their commonly accepted single-letter codes.

15 [0050] "Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the
20 codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes
25 every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid which encodes a polypeptide is implicit in each described sequence with respect to the expression product, but
30 not with respect to actual probe sequences.

[0051] As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded

sequence is a "conservatively modified variant" where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention.

5 [0052] The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (*see, e.g., Creighton, Proteins* (1984)).

15 [0053] A "label" or a "detectable moiety" is a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, chemical, or other physical means. For example, useful labels include ^{32}P , fluorescent dyes, electron-dense reagents, enzymes (*e.g., as commonly used in an ELISA*), biotin, digoxigenin, or haptens and proteins which can be made detectable, *e.g., by incorporating a radiolabel into the peptide or used to detect antibodies specifically reactive with the peptide.*

20 [0054] The term "recombinant" when used with reference, *e.g., to a cell, or nucleic acid, protein, or vector*, indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector, has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein or the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, for example, recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are otherwise abnormally expressed, under expressed or not expressed at all.

25 [0055] The term "heterologous" when used with reference to portions of a nucleic acid indicates that the nucleic acid comprises two or more subsequences that are not found in the same relationship to each other in nature. For instance, the nucleic acid is typically recombinantly produced, having two or more sequences from unrelated genes arranged to make a new functional nucleic acid, *e.g., a promoter from one source and a coding region from another source.* Similarly, a heterologous protein indicates that the protein comprises 30 two or more subsequences that are not found in the same relationship to each other in nature (*e.g., a fusion protein*).

[0056] The phrase “stringent hybridization conditions” refers to conditions under which a probe will hybridize to its target subsequence, typically in a complex mixture of nucleic acids, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generally, stringent conditions are selected to be about 5-10°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength, pH, and nucleic concentration) at which 50% of the probes complementary to the target hybridize to the target sequence at equilibrium (as the target sequences are present in excess, at T_m , 50% of the probes are occupied at equilibrium). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. For selective or specific hybridization, a positive signal is at least two times background, preferably 10 times background hybridization. Exemplary stringent hybridization conditions can be as following: 50% formamide, 5x SSC, and 1% SDS, incubating at 42°C, or, 5x SSC, 1% SDS, incubating at 65°C, with wash in 0.2x SSC, and 0.1% SDS at 65°C.

[0057] Nucleic acids that do not hybridize to each other under stringent conditions are still substantially identical if the polypeptides which they encode are substantially identical. This occurs, for example, when a copy of a nucleic acid is created using the maximum codon degeneracy permitted by the genetic code. In such cases, the nucleic acids typically hybridize under moderately stringent hybridization conditions. Exemplary “moderately stringent hybridization conditions” include a hybridization in a buffer of 40% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37°C, and a wash in 1X SSC at 45°C. A positive hybridization is at least twice background. Those of ordinary skill will readily recognize that alternative hybridization and wash conditions can be utilized to provide conditions of similar stringency. Additional guidelines for determining hybridization parameters are provided in numerous reference, e.g., and *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, *et al.*, John Wiley & Sons.

[0058] For PCR, a temperature of about 36°C is typical for low stringency amplification, although annealing temperatures may vary between about 32°C and 48°C depending on primer length. For high stringency PCR amplification, a temperature of about 62°C is typical, although high stringency annealing temperatures can range from about 50°C to about

65°C, depending on the primer length and specificity. Typical cycle conditions for both high and low stringency amplifications include a denaturation phase of 90°C - 95°C for 30 sec - 2 min., an annealing phase lasting 30 sec. - 2 min., and an extension phase of about 72°C for 1 - 2 min. Protocols and guidelines for low and high stringency amplification reactions are provided, e.g., in Innis *et al.* (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.).

[0059] "Antibody" refers to a polypeptide comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an antigen. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon, and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Typically, the antigen-binding region of an antibody will be most critical in specificity and affinity of binding.

[0060] An exemplary immunoglobulin (antibody) structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these light and heavy chains respectively.

[0061] Antibodies exist, e.g., as intact immunoglobulins or as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce $F(ab)'_2$, a dimer of Fab which itself is a light chain joined to V_H-C_H1 by a disulfide bond. The $F(ab)'_2$ may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the $F(ab)'_2$ dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially Fab with part of the hinge region (see *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed. 1993). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by using recombinant DNA methodology. Thus, the term antibody, as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies, or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies (e.g., single

chain Fv) or those identified using phage display libraries (*see, e.g., McCafferty et al., Nature* 348:552-554 (1990))

[0062] For preparation of suitable antibodies of the invention and for use according to the invention, e.g., recombinant, monoclonal, or polyclonal antibodies, many techniques known in the art can be used (*see, e.g., 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); and Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986)). The genes encoding the heavy and light chains of an antibody of interest can be cloned from a cell, e.g., the genes encoding a monoclonal antibody can be cloned from a hybridoma and used to produce a recombinant monoclonal antibody. Gene libraries encoding heavy and light chains of monoclonal antibodies can also be made from hybridoma or plasma cells. Random combinations of the heavy and light chain gene products generate a large pool of antibodies with different antigenic specificity (*see, e.g., Kubly, Immunology* (3rd ed. 1997)). Techniques for the production of single chain antibodies or recombinant antibodies (U.S. Patent 4,946,778, U.S. Patent No. 4,816,567) can be adapted to produce antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms such as other mammals, may be used to express humanized or human antibodies (*see, e.g., U.S. Patent 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); and Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)). Alternatively, phage display technology can be used to identify antibodies and heteromeric Fab fragments that specifically bind to selected antigens (*see, e.g., McCafferty et al., Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al., Biotechnology* 10:779-783 (1992)). Antibodies can also be made bispecific, i.e., able to recognize two different antigens (*see, e.g., WO 93/08829, Traunecker et al., EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); and Suresh *et al., Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Antibodies can also be heteroconjugates, e.g., two covalently joined antibodies, or immunotoxins (*see, e.g., U.S. Patent No. 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; and EP* 03089).

[0063] Methods for humanizing or primatizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced

into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as import residues, which are typically taken from an import variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (see, e.g., Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such humanized antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

[0064] A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, e.g., an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a different or altered antigen specificity. The preferred antibodies of, and for use according to the invention include humanized and/or chimeric monoclonal antibodies.

[0065] In one embodiment, the antibody is conjugated to an "effector" moiety. The effector moiety can be any number of molecules, including labeling moieties such as radioactive labels or fluorescent labels, or can be a therapeutic moiety. In one aspect the antibody modulates the activity of the protein. Such effector moieties include, but are not limited to, an anti-tumor drug, a toxin, a radioactive agent, a cytokine, a second antibody or an enzyme. Further, the invention provides an embodiment wherein the antibody of the invention is linked to an enzyme that converts a prodrug into a cytotoxic agent.

[0066] The immunoconjugate can be used for targeting the effector moiety to a N-cadherin positive cell, particularly cells, which express the N-cadherin protein. Such differences can be readily apparent when viewing the bands of gels with approximately similarly loaded with test and controls samples.. Examples of cytotoxic agents include, but are not limited to ricin, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethiduium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphteria

toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, and glucocorticoid and other chemotherapeutic agents, as well as radioisotopes. Suitable detectable markers include, but are not limited to, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme.

5 [0067] In some embodiments, the invention provides antibodies to N-cadherin. N-cadherin antibodies may be used systemically to treat cancer (e.g., prostate or bladder cancer) alone or when conjugated with an effector moiety. N-cadherin antibodies conjugated with toxic agents, such as ricin, as well as unconjugated antibodies may be useful therapeutic agents naturally targeted to N-cadherin-bearing prostate cancer cells. Such antibodies can be
10 useful in blocking invasiveness. Suitable N-cadherin antibodies for use according to the invention include, but are not limited to, EC4 1H7, 1F12, 2B3, as well as the antibodies disclosed in USSN 61/113,042 and 61/113,054, herein incorporated by reference in their entirety.

[0068] Additionally, the recombinant protein of the invention comprising the antigen-
15 binding region of any of the monoclonal antibodies of the invention can be used to treat cancer. In such a situation, the antigen-binding region of the recombinant protein is joined to at least a functionally active portion of a second protein having therapeutic activity. The second protein can include, but is not limited to, an enzyme, lymphokine, oncostatin or toxin. Suitable toxins include doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin,
20 etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, ricin, abrin, glucocorticoid and radioisotopes.

[0069] Techniques for conjugating therapeutic agents to antibodies are well known (see, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer
25 Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp.
30 475-506 (1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)).

[0070] The phrase “specifically (or selectively) binds” to an antibody or “specifically (or selectively) immunoreactive with,” when referring to a protein or peptide, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the protein, often in a heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibodies bind to a particular protein at least two times the background and more typically more than 10 to 100 times background. Specific binding to an antibody under such conditions requires an antibody that is selected for its specificity for a particular protein. For example, polyclonal antibodies can be selected to obtain only those polyclonal antibodies that are specifically immunoreactive with the selected antigen and not with other proteins.

10 This selection may be achieved by subtracting out antibodies that cross-react with other molecules. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (*see, e.g., Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998) for a description of

15 immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity).

[0071] By “therapeutically effective dose or amount” herein is meant a dose that produces effects for which it is administered. The exact dose and formulation will depend on the purpose of the treatment, and will be ascertainable by one skilled in the art using known techniques (*see, e.g., 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 Edition, Gennaro, Editor (2003), and Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

20

[0072] The term “pharmaceutically acceptable salts” or “pharmaceutically acceptable carrier” is meant to include salts of the active compounds which are prepared with relatively nontoxic acids or bases, depending on the particular substituents found on the compounds described herein. When compounds of the present invention contain relatively acidic functionalities, base addition salts can be obtained by contacting the neutral form of such compounds with a sufficient amount of the desired base, either neat or in a suitable inert solvent. Examples of pharmaceutically acceptable base addition salts include sodium, potassium, calcium, ammonium, organic amino, or magnesium salt, or a similar salt. When compounds of the present invention contain relatively basic functionalities, acid addition salts can be obtained by contacting the neutral form of such compounds with a sufficient amount

25

30

of the desired acid, either neat or in a suitable inert solvent. Examples of pharmaceutically acceptable acid addition salts include those derived from inorganic acids like hydrochloric, hydrobromic, nitric, carbonic, monohydrogencarbonic, phosphoric, monohydrogenphosphoric, dihydrogenphosphoric, sulfuric, monohydrogensulfuric, hydriodic, or phosphorous acids and the like, as well as the salts derived from relatively nontoxic organic acids like acetic, propionic, isobutyric, maleic, malonic, benzoic, succinic, suberic, fumaric, lactic, mandelic, phthalic, benzenesulfonic, p-tolylsulfonic, citric, tartaric, methanesulfonic, and the like. Also included are salts of amino acids such as arginate and the like, and salts of organic acids like glucuronic or galactunoric acids and the like (*see, e.g.,* Berge *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977)). Certain specific compounds of the present invention contain both basic and acidic functionalities that allow the compounds to be converted into either base or acid addition salts. Other pharmaceutically acceptable carriers known to those of skill in the art are suitable for the present invention.

[0073] The neutral forms of the compounds may be regenerated by contacting the salt with a base or acid and isolating the parent compound in the conventional manner. The parent form of the compound differs from the various salt forms in certain physical properties, such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to the parent form of the compound for the purposes of the present invention.

[0074] In addition to salt forms, the present invention provides compounds which are in a prodrug form. Prodrugs of the compounds described herein are those compounds that readily undergo chemical changes under physiological conditions to provide the compounds of the present invention. Additionally, prodrugs can be converted to the compounds of the present invention by chemical or biochemical methods in an *ex vivo* environment. For example, prodrugs can be slowly converted to the compounds of the present invention when placed in a transdermal patch reservoir with a suitable enzyme or chemical reagent.

[0075] Certain compounds of the present invention can exist in unsolvated forms as well as solvated forms, including hydrated forms. In general, the solvated forms are equivalent to unsolvated forms and are intended to be encompassed within the scope of the present invention. Certain compounds of the present invention may exist in multiple crystalline or amorphous forms. In general, all physical forms are equivalent for the uses contemplated by the present invention and are intended to be within the scope of the present invention.

30

[0076] Certain compounds of the present invention possess asymmetric carbon atoms (optical centers) or double bonds; the racemates, diastereomers, geometric isomers and individual isomers are all intended to be encompassed within the scope of the present invention.

- 5 [0077] Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) refers to the acquisition of stromal features by epithelial tumor cells. In cancer, EMT is associated with invasive and motile behavior and may be central process underlying metastasis. EMT is associated with poor prognosis and is mediated by multiple transcription factors, such as, SNAIL, SLUG and TWIST.

10 **Detailed Embodiments**

- [0078] The present invention provides methods of diagnosis and providing a prognosis for individuals at risk for a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript, particularly urogenital cancers including prostate and/or bladder cancer. The methods generally comprise contacting a test tissue sample from an individual at risk of having a
- 15 cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript with an antibody that specifically binds to a N-Cadherin protein; and determining the presence or absence of a N-Cadherin protein in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript. Typically, the tissue sample is serum, but can also be a tissue from a biopsy,
- 20 particularly from a urogenital tissue including prostate tissue or bladder tissue. Usually, the antibody is a monoclonal antibody. A positive diagnosis for a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript is indicated when a higher level of N-Cadherin protein is detected in a test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known not to have cancer, for example, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,
- 25 100%, 2-fold, 3-fold, 4-fold higher or more. The detection methods can be carried out, for example, using standard ELISA techniques known in the art (*reviewed in* Gosling, *Immunoassays: A Practical Approach*, 2000, Oxford University Press). Detection is accomplished by labeling a primary antibody or a secondary antibody with, for example, a radioactive isotope, a fluorescent label, an enzyme or any other detectable label known in the
- 30 art.

[0079] In another embodiment, invention provides methods of diagnosis and providing a prognosis for individuals at risk for a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA

transcript, particularly a prostate or bladder cancer, by contacting a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript with a primer set of a first oligonucleotide and a second oligonucleotide that each specifically hybridize to a N-Cadherin nucleic acid; amplifying the N-Cadherin nucleic acid in the
5 sample; and determining the presence or absence of the N-Cadherin nucleic acid in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript. Again, usually the tissue sample is serum, but can also be a tissue from a biopsy, particularly a urogenital tissue including a prostate or bladder tissue. A positive diagnosis for a cancer that
10 expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript is indicated when a higher level of N-Cadherin transcribed RNA is detected in a test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known not to have cancer.

[0080] The invention also provides methods for improving the response to cancer therapy in a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript by administering a
15 therapeutically effective amount of a compound that inhibits the binding of N-Cadherin protein to, respectively, a N-Cadherin receptor on a cell of the cancer tumor tissue. In some embodiments the methods of inhibiting N-Cadherin binding to its receptor are carried out concurrently with another anticancer therapy, including, for example, known chemotherapeutics, immunotherapeutics, and radiotherapy for the reversal of resistance,
20 tumor progression, and metastasis.

[0081] The present invention further provides methods of inhibiting the growth of and promoting the regression of a tumor that expresses N-Cadherin protein, the methods comprising inhibiting the binding of N-Cadherin protein to, respectively, a N-Cadherin
25 receptor on a cell of the tumor tissue. The methods can be carried out by administering to an individual in need thereof a sufficient amount of a compound that inhibits the binding of a N-Cadherin protein to respectively, a N-Cadherin receptor. In some embodiments, the compound specifically binds to a N-Cadherin protein. In some embodiments, the compound specifically binds to a N-Cadherin receptor. In some embodiments, the compound prevents the transcription or the translation of a N-Cadherin protein. The methods find particular use
30 in treating prostate and bladder cancer. In some embodiments, the compound comprises a polypeptide, including an antibody or an analog or fragment of a N-Cadherin polypeptide.

[0082] The methods find particular application in the diagnosis, prognosis and treatment of prostate and bladder cancers. In certain embodiments the methods are applied to hormone refractory or therapy resistant cancers. In certain embodiments the methods are applied to metastatic cancers. For example comparisons of differential expression of a N-Cadherin protein and/or mRNA can be used to determine the stage of cancer of an individual having a cancer that expresses a N-Cadherin protein or mRNA transcript.

[0083] Treatment will generally involve the repeated administration of the anti- N-Cadherin antibodies, immunoconjugates, inhibitors, and siRNA preparations via an acceptable route of administration such as intravenous injection (IV), at an effective dose.

10 Dosages will depend upon various factors generally appreciated by those of skill in the art, including without limitation the type of cancer and the severity, grade, or stage of the cancer, the binding affinity and half life of the agents used, the degree of N-Cadherin expression in the patient, the extent of circulating shed N-Cadherin antigen, the desired steady-state antibody concentration level, frequency of treatment, and the influence of chemotherapeutic agents used in combination with the treatment method of the invention. Typical daily doses may range from about 0.1 to 100 mg/kg. Doses in the range of 10-500 mg of the mAb or immunoconjugates per week may be effective and well tolerated, although even higher weekly doses may be appropriate and/or well tolerated. The principal determining factor in defining the appropriate dose is the amount of a particular agent necessary to be

15 therapeutically effective in a particular context. Repeated administrations may be required in order to achieve tumor inhibition or regression. Initial loading doses may be higher. The initial loading dose may be administered as an infusion. Periodic maintenance doses may be administered similarly, provided the initial dose is well tolerated.

[0084] Direct administration of the agents is also possible and may have advantages in certain contexts. For example, for the treatment of bladder carcinoma, the agents may be injected directly into the bladder. Because agents administered directly to bladder will be cleared from the patient rapidly, it may be possible to use non-human or chimeric antibodies effectively without significant complications of antigenicity.

[0085] The invention further provides vaccines formulated to contain a N-Cadherin protein or fragment thereof. The use of a tumor antigen in a vaccine for generating humoral and cell-mediated immunity for use in anti-cancer therapy is well known in the art and, for example, has been employed in prostate cancer using human PSMA and rodent PAP immunogens

30

(Hodge et al., 1995, *Int. J. Cancer* 63: 231-237; Fong et al., 1997, *J. Immunol.* 159: 3113-3117). Such methods can be readily practiced by employing a N-Cadherin protein, or fragment thereof, or a N-Cadherin -encoding nucleic acid molecule and recombinant vectors capable of expressing and appropriately presenting the N-Cadherin immunogen.

- 5 [0086] For example, viral gene delivery systems may be used to deliver a N-Cadherin - encoding nucleic acid molecule. Various viral gene delivery systems which can be used in the practice of this aspect of the invention include, but are not limited to, vaccinia, fowlpox, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, adeno-associated virus, lentivirus, and sindbus virus (Restifo, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8: 658-663). Non-viral delivery systems may also
10 be employed by using naked DNA encoding a N-Cadherin protein or fragment thereof introduced into the patient (e.g., intramuscularly) to induce an anti-tumor response. In one embodiment, the full-length human N-Cadherin cDNA may be employed. In another embodiment, N-Cadherin nucleic acid molecules encoding specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes may be employed. CTL epitopes can be determined using specific algorithms
15 (e.g., Epimer, Brown University) to identify peptides within a N-cadherin protein which are capable of optimally binding to specified HLA alleles.

- [0087] Various ex vivo strategies may also be employed. One approach involves the use of dendritic cells to present N-Cadherin antigen to a patient's immune system. Dendritic cells express MHC class I and II, B7 costimulator, and IL-12, and are thus highly specialized
20 antigen presenting cells. In prostate cancer, autologous dendritic cells pulsed with peptides of the N-Cadherin can be used to stimulate prostate cancer patients' immune systems (Tjoa et al., 1996, *Prostate* 28: 65-69; Murphy et al., 1996, *Prostate* 29: 371-380). Dendritic cells can be used to present N-Cadherin peptides to T cells in the context of MHC class I and II molecules. In one embodiment, autologous dendritic cells are pulsed with N-Cadherin
25 peptides capable of binding to MHC molecules. In another embodiment, dendritic cells are pulsed with the complete N-Cadherin protein. Yet another embodiment involves engineering the expression of the N-Cadherin gene in dendritic cells using various implementing vectors known in the art, such as adenovirus (Arthur et al., 1997, *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25), retrovirus (Henderson et al., 1996, *Cancer Res.* 56: 3763-3770), lentivirus, adeno-associated
30 virus, DNA transfection (Ribas et al., 1997, *Cancer Res.* 57: 2865-2869), and tumor-derived RNA transfection (Ashley et al., 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182).

- [0088] Anti-idiotypic anti- N-Cadherin antibodies can also be used in anti-cancer therapy as a vaccine for inducing an immune response to cells expressing a N-Cadherin protein, respectively. Specifically, the generation of anti-idiotypic antibodies is well known in the art and can readily be adapted to generate anti-idiotypic anti- N-Cadherin antibodies that
- 5 respectively mimic an epitope on a N-Cadherin protein (see, for example, Wagner et al., 1997, Hybridoma 16: 33-40; Foon et al., 1995, J Clin Invest 96: 334-342; Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43: 65-76). Such an anti-idiotypic antibody can be used in anti-idiotypic therapy as presently practiced with other anti-idiotypic antibodies directed against tumor antigens.
- 10 [0089] Genetic immunization methods may be employed to generate prophylactic or therapeutic humoral and cellular immune responses directed against cancer cells expressing N-Cadherin . Using the N-Cadherin -encoding DNA molecules described herein, constructs comprising DNA encoding a N-Cadherin protein/immunogen and appropriate regulatory sequences may be injected directly into muscle or skin of an individual, such that the cells of
- 15 the muscle or skin take-up the construct and express the encoded N-Cadherin protein/immunogen. The N-Cadherin protein/immunogen may be expressed as a cell surface protein or be secreted. Expression of the N-Cadherin protein/immunogen results in the generation of prophylactic or therapeutic humoral and cellular immunity against prostate cancer. Various prophylactic and therapeutic genetic immunization techniques known in the
- 20 art may be used (for review, see information and references published at internet address www.genweb.com).
- [0090] The invention further provides methods for inhibiting cellular activity (e.g., cell proliferation, activation, or propagation) of a cell expressing multiple N-Cadherin antigens on its cell surface. This method comprises reacting the immunoconjugates of the invention
- 25 (e.g., a heterogeneous or homogenous mixture) with the cell so that the N-Cadherin antigens on the cell surface forms a complex with the immunoconjugates. The greater the number of N-Cadherin antigens on the cell surface, the greater the number of N-Cadherin -antibody complexes that can, respectively, be used. The greater the number of N-Cadherin -antibody complexes the greater the cellular activity that is inhibited.
- 30 [0091] A heterogeneous mixture includes N-Cadherin antibodies that recognize different or the same epitope, each antibody being conjugated to the same or different therapeutic

agent. A homogenous mixture includes antibodies that recognize the same epitope, each antibody being conjugated to the same therapeutic agent.

[0092] The invention further provides methods for inhibiting the biological activity of N-Cadherin by respectively blocking N-Cadherin from binding its receptor. The methods
5 comprises contacting an amount of N-Cadherin with an antibody or immunoconjugate of the invention under conditions that permit a N-Cadherin -immunoconjugate or N-Cadherin - antibody complex thereby, respectively, blocking N-Cadherin from binding its ligand and inhibiting the activity of N-Cadherin .

[0093] In some embodiments, the invention provides a method of treating cancer,
10 particularly a cancer which expresses N-Cadherin , or of inhibiting the growth of a cancer cell expressing a N-Cadherin protein by treating a subject or contacting the cancer cell with an antibody or fragment thereof that recognizes and binds the N-Cadherin protein in an amount effective to inhibit the growth of the cancer cell. In some embodiments, the cancer cell is a prostate cancer cell or a bladder cancer cell. The contacting antibody can be a monoclonal
15 antibody and/or a chimeric antibody. In some embodiments, the chimeric antibody comprises a human immunoglobulin constant region. In some embodiments, the antibody is a human antibody or comprises a human immunoglobulin constant region. In further embodiments, the antibody fragment comprises an Fab, F(ab)₂, or Fv. In other embodiments, the fragment comprises a recombinant protein having an antigen-binding region.

[0094] In another embodiment, the invention provides methods for treating cancer,
20 particularly, a cancer expressing N-Cadherin or selectively inhibiting a cell expressing a N-Cadherin antigen by reacting any one or a combination of the immunoconjugates of the invention with the cell in an amount sufficient to inhibit the cell. Such amounts include an amount to kill the cell or an amount sufficient to inhibit cell growth or proliferation. As
25 discussed supra the dose and dosage regimen will depend on the nature of the disease or disorder to be treated associated with N-Cadherin , its population, the site to which the antibodies are to be directed, the characteristics of the particular immunotoxin, and the patient. For example, the amount of immunoconjugate can be in the range of 0.1 to 200 mg/kg of patient weight. The immunoconjugate can comprise the anti- N-Cadherin antibody
30 or the fragment linked to a therapeutic agent. The therapeutic agent can be cytotoxic agent. The cytotoxic agent can be selected from a group consisting of ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, etiduidim bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide,

vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diptheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, arbrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin mitogellin, retstrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor, maytansinoids, and glucocorticoidricin. The therapeutic agent can be a radioactive isotope. The therapeutic isotope can be selected from the group consisting of ^{212}Bi , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y and ^{186}Re .

[0095] In any of the embodiments above, a chemotherapeutic drug and/or radiation therapy can be administered further. In some embodiments, the patient also receives hormone antagonist therapy. The contacting of the patient with the antibody or antibody fragment, can be by administering the antibody to the patient intravenously, intraperitoneally, intramuscularly, intratumorally, or intradermally. In some embodiments, the patient has a urogenital cancer (e.g., bladder cancer, prostate cancer). In some embodiments of the above, the patient suffers from prostate cancer and optionally further receives patient hormone ablation therapy. In some embodiments, the contacting comprises administering the antibody directly into the cancer or a metastasis of the cancer.

[0096] In some embodiments, the immunoconjugate has a cytotoxic agent which is a small molecule. Toxins such as maytansin, maytansinoids, saporin, gelonin, ricin or calicheamicin and analogs or derivatives thereof are also suitable. Other cytotoxic agents that can be conjugated to the anti- N-Cadherin antibodies include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil. Enzymatically active toxins and fragments thereof can also be used. The radio-effector moieties may be incorporated in the conjugate in known ways (e.g., bifunctional linkers, fusion proteins). The antibodies of the present invention may also be conjugated to an effector moiety which is an enzyme which converts a prodrug to an active chemotherapeutic agent. See, WO 88/07378; U. S. Patent No. 4,975, 278; and U.S. Patent No. 6,949,245. The antibody or immunoconjugate may optionally be linked to nonprotein polymers (e. g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol).

[0097] Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using methods well known in the art (see, U.S. Patent No. 6,949,245). For instance, the conjugates may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as

glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in
5 Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari
10 et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)) may be used.

Methods of Administration and Formulation

[0098] The anti- N-cadherin antibodies or immunoconjugates are administered to a human patient in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal,
15 intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous or subcutaneous administration of the antibody is preferred. The administration may be local or systemic.

[0099] The compositions for administration will commonly comprise an agent as described herein (e.g., N-cadherin inhibitors, N-cadherin antibodies and immunoconjugates, N-cadherin
20 siRNA and vectors thereof) dissolved in a pharmaceutically acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., buffered saline and the like. These solutions are sterile and generally free of undesirable matter. These compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate
25 physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sodium lactate and the like. The concentration of active agent in these formulations can vary widely, and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, body weight and the like in accordance with the particular mode of administration selected and the
30 patient's needs.

[0100] Thus, a typical pharmaceutical composition for intravenous administration will vary according to the agent. Actual methods for preparing parenterally administrable

compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in such publications as Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[0189] The pharmaceutical compositions can be administered in a variety of unit dosage forms depending upon the method of administration. For example, unit dosage forms suitable for oral administration include, but are not limited to, powder, tablets, pills, capsules and lozenges. It is recognized that antibodies when administered orally, should be protected from digestion. This is typically accomplished either by complexing the molecules with a composition to render them resistant to acidic and enzymatic hydrolysis, or by packaging the molecules in an appropriately resistant carrier, such as a liposome or a protection barrier. Means of protecting agents from digestion are well known in the art.

[0101] Pharmaceutical formulations, particularly, of the antibodies and immunoconjugates and inhibitors for use with the present invention can be prepared by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers. Such formulations can be lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations used. Acceptable carriers, excipients or stabilizers can be acetate, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants (e.g., ascorbic acid) preservatives low molecular weight polypeptides; proteins, such as serum albumin or gelatin, or hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; and amino acids, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents; and ionic and non-ionic surfactants (e.g., polysorbate); salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants. The antibody can be formulated at a concentration of between 0.5 - 200 mg/ml, or between 10-50 mg/ml.

[0102] The formulation may also provide additional active compounds, including, chemotherapeutic agents, cytotoxic agents, cytokines, growth inhibitory agent, and anti-hormonal agent. The active ingredients may also prepared as sustained-release preparations (e.g., semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers (e.g., polyesters, hydrogels (for example, poly (2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly (vinylalcohol)), polylactides. The antibodies and immunoconjugates may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example,

hydroxymethylcellulose or gelatin microcapsules and poly- (methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions.

5 [0103] The compositions can be administered for therapeutic or prophylactic treatments. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient suffering from a disease (e.g., cancer) in a "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's health. Single or multiple administrations of the compositions may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the patient. A "patient" or "subject" for the purposes of the present invention includes both humans and other animals, particularly mammals. Thus the methods are applicable to both human therapy and veterinary applications. In the preferred embodiment the patient is a mammal, preferably a primate, and in the most preferred embodiment the patient is human. Other known cancer therapies can be used in combination with the methods of the invention. For example, the compositions for use according to the invention may also be used to target or sensitize a cell to other cancer therapeutic agents such as 5FU, vinblastine, actinomycin D, cisplatin, methotrexate, and the like.

[0104] In other embodiments, the methods of the invention with other cancer therapies (e.g., radical prostatectomy), radiation therapy (external beam or brachytherapy), hormone therapy (e.g., orchiectomy, LHRH-analog therapy to suppress testosterone production, anti-androgen therapy), or chemotherapy. Radical prostatectomy involves removal of the entire prostate gland plus some surrounding tissue. This treatment is used commonly when the cancer is thought not to have spread beyond the tissue. Radiation therapy is commonly used to treat prostate cancer that is still confined to the prostate gland, or has spread to nearby tissue. If the disease is more advanced, radiation may be used to reduce the size of the tumor. Hormone therapy is often used for patients whose prostate cancer has spread beyond the prostate or has recurred. The objective of hormone therapy is to lower levels of the male hormones, androgens and thereby cause the prostate cancer to shrink or grow more slowly. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists decrease the production of testosterone. These agents may be injected either monthly or longer. Two such analogs are leuprolide and goserelin. Anti-androgens (e.g., flutamide, bicalutamide, and nilutamide) may also be used. Total androgen blockade refers to the use of anti-androgens in combination with orchiectomy

or LHRH analogs, the s combination is called. Chemotherapy is an option for patients whose prostate cancer has spread outside of the prostate gland and for whom hormone therapy has failed. It is not expected to destroy all of the cancer cells, but it may slow tumor growth and reduce pain. Some of the chemotherapy drugs used in treating prostate cancer that has returned or continued to grow and spread after treatment with hormonal therapy include doxorubicin (Adriamycin), estramustine, etoposide, mitoxantrone, vinblastine, and paclitaxel. Two or more drugs are often given together to reduce the likelihood of the cancer cells becoming resistant to chemotherapy. Small cell carcinoma is a rare type of prostate cancer that is more likely to respond to chemotherapy than to hormonal therapy.

- 10 [0105] In some embodiments, a "cardioprotectant" is also administered with the N-cadherin antibody, N-cadherin binding inhibitor, or N-cadherin siRNA molecule for use to according to the invention (see, U.S. Patent No. 6,949,245). A cardioprotectant is a compound or composition which prevents or reduces myocardial dysfunction (i.e. cardiomyopathy and/or congestive heart failure) associated with administration of a drug, such as an anthracycline antibiotic to a patient. The cardioprotectant may, for example, block or reduce a free-radical-mediated cardiotoxic effect and/or prevent or reduce oxidative-stress injury. Examples of cardioprotectants encompassed by the present definition include the iron-chelating agent dexrazoxane (ICRF-187) (Seifert et al. The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072 (1994)); a lipid-lowering agent and/or anti-oxidant such as probucol (Singal et al. J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063 (1995)); amifostine (aminothiol 2-[(3-aminopropyl)amino]ethanethiol-dihydrogen phosphate ester, also called WR-2721, and the dephosphorylated cellular uptake form thereof called WR-1065) and S-3-(3-methylaminopropylamino)propylphosphoro- thioic acid (WR-151327), see Green et al. Cancer Research 54:738-741 (1994); digoxin (Bristow, M. R. In: Bristow M R, ed. Drug-Induced Heart Disease. New York: Elsevier 191-215 (1980)); beta-blockers such as metoprolol (Hjalmarson et al. Drugs 47:Suppl 4:31-9 (1994); and Shaddy et al. Am. Heart J. 129:197-9 (1995)); vitamin E; ascorbic acid (vitamin C); free radical scavengers such as oleanolic acid, ursolic acid and N-acetylcysteine (NAC); spin trapping compounds such as alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN); (Paracchini et al., Anticancer Res. 13:1607-1612 (1993)); selenoorganic compounds such as P251 (Elbesen); and the like.

[0106] The combined administrations contemplates coadministration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either

order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

[0107] Molecules and compounds identified that indirectly or directly modulate the expression and/or function of a N-cadherin protein can be useful in treating cancers that, respectively, express N-cadherin. N-cadherin protein modulators can be administered alone or co-administered in combination with conventional chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy as well as currently developed therapeutics.

[0108] Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the packaged nucleic acid suspended in diluents, such as water, saline or PEG 400; (b) capsules, sachets or tablets, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as liquids, solids, granules or gelatin; (c) suspensions in an appropriate liquid; and (d) suitable emulsions. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, calcium phosphates, corn starch, potato starch, microcrystalline cellulose, gelatin, colloidal silicon dioxide, talc, magnesium stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, fillers, binders, diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, dyes, disintegrating agents, and pharmaceutically compatible carriers. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, e.g., sucrose, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, carriers known in the art.

[0109] The compound of choice, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

[0110] Suitable formulations for rectal administration include, for example, suppositories, which consist of the packaged nucleic acid with a suppository base. Suitable suppository bases include natural or synthetic triglycerides or paraffin hydrocarbons. In addition, it is also possible to use gelatin rectal capsules which consist of a combination of the compound of choice with a base, including, for example, liquid triglycerides, polyethylene glycols, and paraffin hydrocarbons.

[0111] Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intraarticular (in the joints), intravenous, intramuscular, intratumoral, intradermal,

42

intraperitoneal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. In the practice of this invention, compositions can be administered, for example, by intravenous infusion, orally, topically, intraperitoneally, intravesically or intrathecally. Parenteral administration, oral administration, and intravenous administration are the preferred methods of administration. The formulations of compounds can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials.

10 [0112] Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. Cells transduced by nucleic acids for *ex vivo* therapy can also be administered intravenously or parenterally as described above.

[0113] The pharmaceutical preparation is preferably in unit dosage form. In such form the preparation is subdivided into unit doses containing appropriate quantities of the active component. The unit dosage form can be a packaged preparation, the package containing discrete quantities of preparation, such as packeted tablets, capsules, and powders in vials or ampoules. Also, the unit dosage form can be a capsule, tablet, cachet, or lozenge itself, or it can be the appropriate number of any of these in packaged form. The composition can, if desired, also contain other compatible therapeutic agents.

20 [0114] Preferred pharmaceutical preparations deliver one or more active N-cadherin protein modulators, optionally in combination with one or more chemotherapeutic agents or immunotherapeutic agents, in a sustained release formulation. Typically, the N-cadherin modulator is administered therapeutically as a sensitizing agent that increases the susceptibility of tumor cells to other cytotoxic cancer therapies, including chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy and hormonal therapy.

[0115] In therapeutic use for the treatment of cancer, the N-cadherin modulators or inhibitors utilized in the pharmaceutical method of the invention are administered at the initial dosage of about 0.001 mg/kg to about 1000 mg/kg daily. A daily dose range of about 0.01 mg/kg to about 500 mg/kg, or about 0.1 mg/kg to about 200 mg/kg, or about 1 mg/kg to about 100 mg/kg, or about 10 mg/kg to about 50 mg/kg, can be used. The dosages, however, may be varied depending upon the requirements of the patient, the severity of the condition being treated, and the compound being employed. For example, dosages can be empirically

determined considering the type and stage of cancer diagnosed in a particular patient. The dose administered to a patient, in the context of the present invention should be sufficient to effect a beneficial therapeutic response in the patient over time. The size of the dose also will be determined by the existence, nature, and extent of any adverse side-effects that accompany the administration of a particular vector, or transduced cell type in a particular patient. Determination of the proper dosage for a particular situation is within the skill of the practitioner. Generally, treatment is initiated with smaller dosages which are less than the optimum dose of the compound. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under circumstances is reached. For convenience, the total daily dosage may be divided and administered in portions during the day, if desired.

[0116] The pharmaceutical preparations (e.g., N-cadherin siRNAs, N-cadherin antibodies, N-cadherin vaccines, N-cadherin inhibitors, and immunoconjugates) for use according to the invention are typically delivered to a mammal, including humans and non-human mammals. Non-human mammals treated using the present methods include domesticated animals (*i.e.*, canine, feline, murine, rodentia, and lagomorpha) and agricultural animals (bovine, equine, ovine, porcine).

Assays for modulators of N-Cadherin protein

[0117] Modulation of a N-Cadherin protein, and corresponding modulation of cellular, e.g., tumor cell, proliferation, can be assessed using a variety of *in vitro* and *in vivo* assays, including cell-based models. Such assays can be used to test for inhibitors and activators of a N-Cadherin protein, and, consequently, inhibitors and activators of cellular proliferation, including modulators of chemotherapeutic sensitivity and toxicity. Such modulators of a N-Cadherin protein are useful for treating disorders related to pathological cell proliferation, e.g., cancer. Modulators of N-Cadherin protein are tested using either recombinant or naturally occurring N-Cadherin, preferably human N-Cadherin.

[0118] Measurement of cellular proliferation modulation with a N-Cadherin protein or a cell expressing a N-Cadherin protein, either recombinant or naturally occurring, can be performed using a variety of assays, *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*, as described herein. A suitable physical, chemical or phenotypic change that affects activity, e.g., enzymatic activity such as kinase activity, cell proliferation, or ligand binding (e.g., a N-Cadherin protein receptor) can be used to assess the influence of a test compound on the polypeptide of this

invention. When the functional effects are determined using intact cells or animals, one can also measure a variety of effects, such as, ligand binding, kinase activity, transcriptional changes to both known and uncharacterized genetic markers (e.g., northern blots), changes in cell metabolism, changes related to cellular proliferation, cell surface marker expression, DNA synthesis, marker and dye dilution assays (e.g., GFP and cell tracker assays), contact inhibition, tumor growth in nude mice, etc.

In vitro assays

[0119] Assays to identify compounds with N-Cadherin modulating activity can be performed *in vitro*. Such assays can use a full length N-Cadherin protein or a variant thereof (see, e.g., Figures 6 and 7, respectively), or a mutant thereof, or a fragment of a N-Cadherin protein. Purified recombinant or naturally occurring N-Cadherin protein can be used in the *in vitro* methods of the invention. In addition to purified N-Cadherin protein, the recombinant or naturally occurring N-Cadherin protein can be part of a cellular lysate or a cell membrane. As described below, the binding assay can be either solid state or soluble. Preferably, the protein or membrane is bound to a solid support, either covalently or non-covalently. Often, the *in vitro* assays of the invention are substrate or ligand binding or affinity assays, either non-competitive or competitive. Other *in vitro* assays include measuring changes in spectroscopic (e.g., fluorescence, absorbance, refractive index), hydrodynamic (e.g., shape), chromatographic, or solubility properties for the protein. Other *in vitro* assays include enzymatic activity assays, such as phosphorylation or autophosphorylation assays).

[0120] In one embodiment, a high throughput binding assay is performed in which the N-Cadherin protein or a fragment thereof is contacted with a potential modulator and incubated for a suitable amount of time. In one embodiment, the potential modulator is bound to a solid support, and the N-Cadherin protein is added. In another embodiment, the N-Cadherin protein is bound to a solid support. A wide variety of modulators can be used, as described below, including small organic molecules, peptides, antibodies, and N-Cadherin ligand analogs. A wide variety of assays can be used to identify N-Cadherin -modulator binding, including labeled protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shifts, immunoassays, enzymatic assays such as kinase assays, and the like. In some cases, the binding of the candidate modulator is determined through the use of competitive binding

assays, where interference with binding of a known ligand or substrate is measured in the presence of a potential modulator.

[0121] In one embodiment, microtiter plates are first coated with either a N-Cadherin protein or a N-Cadherin protein receptor, and then exposed to one or more test compounds potentially capable of inhibiting the binding of a N-Cadherin protein to a N-Cadherin protein receptor. A labeled (*i.e.*, fluorescent, enzymatic, radioactive isotope) binding partner of the coated protein, either a N-Cadherin protein receptor or a N-Cadherin protein, is then exposed to the coated protein and test compounds. Unbound protein is washed away as necessary in between exposures to a N-Cadherin protein, a N-Cadherin protein receptor, or a test compound. An absence of detectable signal indicates that the test compound inhibited the binding interaction between a N-Cadherin protein and, respectively, a N-Cadherin protein receptor. The presence of detectable signal (*i.e.*, fluorescence, colorimetric, radioactivity) indicates that the test compound did not inhibit the binding interaction between a N-Cadherin protein and, respectively, a N-Cadherin protein receptor. The presence or absence of detectable signal is compared to a control sample that was not exposed to a test compound, which exhibits uninhibited signal. In some embodiments the binding partner is unlabeled, but exposed to a labeled antibody that specifically binds the binding partner.

Cell-based *in vivo* assays

[0122] In another embodiment, N-Cadherin protein is expressed in a cell, and functional, *e.g.*, physical and chemical or phenotypic, changes are assayed to identify N-Cadherin and modulators of cellular proliferation, *e.g.*, tumor cell proliferation. Cells expressing N-Cadherin proteins can also be used in binding assays and enzymatic assays. Any suitable functional effect can be measured, as described herein. For example, cellular morphology (*e.g.*, cell volume, nuclear volume, cell perimeter, and nuclear perimeter), ligand binding, kinase activity, apoptosis, cell surface marker expression, cellular proliferation, GFP positivity and dye dilution assays (*e.g.*, cell tracker assays with dyes that bind to cell membranes), DNA synthesis assays (*e.g.*, ³H-thymidine and fluorescent DNA-binding dyes such as BrdU or Hoechst dye with FACS analysis), are all suitable assays to identify potential modulators using a cell based system. Suitable cells for such cell based assays include both primary cancer or tumor cells and cell lines, as described herein, *e.g.*, A549 (lung), MCF7 (breast, p53 wild-type), H1299 (lung, p53 null), Hela (cervical), PC3 (prostate, p53 mutant), MDA-MB-231 (breast, p53 wild-type). Cancer cell lines can be p53 mutant, p53 null, or

express wild type p53. The N-Cadherin protein can be naturally occurring or recombinant. Also, fragments of N-Cadherin or chimeric N-Cadherin proteins can be used in cell based assays.

[0123] Cellular N-Cadherin polypeptide levels can be determined by measuring the level of protein or mRNA. The level of N-Cadherin protein or proteins related to N-Cadherin are measured using immunoassays such as western blotting, ELISA and the like with an antibody that selectively binds, respectively, to the N-Cadherin polypeptide or a fragment thereof. For measurement of mRNA, amplification, e.g., using PCR, LCR, or hybridization assays, e.g., northern hybridization, RNase protection, dot blotting, are preferred. The level of protein or mRNA is detected using directly or indirectly labeled detection agents, e.g., fluorescently or radioactively labeled nucleic acids, radioactively or enzymatically labeled antibodies, and the like, as described herein.

[0124] Alternatively, N-Cadherin expression can be measured using a reporter gene system. Such a system can be devised using an N-Cadherin protein promoter operably linked to a reporter gene such as chloramphenicol acetyltransferase, firefly luciferase, bacterial luciferase, β -galactosidase and alkaline phosphatase. Furthermore, the protein of interest can be used as an indirect reporter via attachment to a second reporter such as red or green fluorescent protein (*see, e.g.,* Mistili & Spector, *Nature Biotechnology* 15:961-964 (1997)). The reporter construct is typically transfected into a cell. After treatment with a potential modulator, the amount of reporter gene transcription, translation, or activity is measured according to standard techniques known to those of skill in the art.

Animal models

[0125] Animal models of cellular proliferation also find use in screening for modulators of cellular proliferation. Similarly, transgenic animal technology including gene knockout technology, for example as a result of homologous recombination with an appropriate gene targeting vector, or gene overexpression, will result in the absence or increased expression of the N-Cadherin protein. The same technology can also be applied to make knock-out cells. When desired, tissue-specific expression or knockout of the N-Cadherin protein may be necessary. Transgenic animals generated by such methods find use as animal models of cellular proliferation and are additionally useful in screening for modulators of cellular proliferation.

[0126] Knock-out cells and transgenic mice can be made by insertion of a marker gene or other heterologous gene into an endogenous N-Cadherin gene site in the mouse genome via homologous recombination. Such mice can also be made by substituting an endogenous N-Cadherin, respectively, with a mutated version of the N-Cadherin gene, or by, respectively, mutating an endogenous N-Cadherin, e.g., by exposure to carcinogens.

[0127] A DNA construct is introduced into the nuclei of embryonic stem cells. Cells containing the newly engineered genetic lesion are injected into a host mouse embryo, which is re-implanted into a recipient female. Some of these embryos develop into chimeric mice that possess germ cells partially derived from the mutant cell line. Therefore, by breeding the chimeric mice it is possible to obtain a new line of mice containing the introduced genetic lesion (*see, e.g., Capecchi et al., Science* 244:1288 (1989)). Chimeric targeted mice can be derived according to Hogan *et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987), and Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (2003).

Exemplary assays

Soft agar growth or colony formation in suspension

[0128] Normal cells require a solid substrate to attach and grow. When the cells are transformed, they lose this phenotype and grow detached from the substrate. For example, transformed cells can grow in stirred suspension culture or suspended in semi-solid media, such as semi-solid or soft agar. The transformed cells, when transfected with tumor suppressor genes, regenerate normal phenotype and require a solid substrate to attach and grow.

[0129] Soft agar growth or colony formation in suspension assays can be used to identify N-Cadherin modulators. Typically, transformed host cells (e.g., cells that grow on soft agar) are used in this assay. For example, RKO or HCT116 cell lines can be used. Techniques for soft agar growth or colony formation in suspension assays are described in Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss, New York (1994), herein incorporated by reference. *See also*, the methods section of Garkavtsev *et al.* (1996), *supra*, herein incorporated by reference.

Contact inhibition and density limitation of growth

[0130] Normal cells typically grow in a flat and organized pattern in a petri dish until they touch other cells. When the cells touch one another, they are contact inhibited and stop growing. When cells are transformed, however, the cells are not contact inhibited and
5 continue to grow to high densities in disorganized foci. Thus, the transformed cells grow to a higher saturation density than normal cells. This can be detected morphologically by the formation of a disoriented monolayer of cells or rounded cells in foci within the regular pattern of normal surrounding cells. Alternatively, labeling index with [³H]-thymidine at saturation density can be used to measure density limitation of growth. See Freshney (1994),
10 *supra*. The transformed cells, when contacted with cellular proliferation modulators, regenerate a normal phenotype and become contact inhibited and would grow to a lower density.

[0131] Contact inhibition and density limitation of growth assays can be used to identify N-Cadherin modulators which are capable of inhibiting abnormal proliferation and
15 transformation in host cells. Typically, transformed host cells (e.g., cells that are not contact inhibited) are used in this assay. For example, RKO or HCT116 cell lines can be used. In this assay, labeling index with [³H]-thymidine at saturation density is a preferred method of measuring density limitation of growth. Transformed host cells are contacted with a potential N-cadherin modulator and are grown for 24 hours at saturation density in non-limiting
20 medium conditions. The percentage of cells labeling with [³H]-thymidine is determined autoradiographically. See, Freshney (1994), *supra*. The host cells contacted with a N-cadherin modulator would give rise to a lower labeling index compared to control (e.g., transformed host cells transfected with a vector lacking an insert).

Growth factor or serum dependence

[0132] Growth factor or serum dependence can be used as an assay to identify N-cadherin modulators. Transformed cells have a lower serum dependence than their normal counterparts (see, e.g., Temin, *J. Natl. Cancer Inst.* 37:167-175 (1966); Eagle *et al.*, *J. Exp. Med.* 131:836-879 (1970)); Freshney, *supra*. This is in part due to release of various growth factors by the transformed cells. When transformed cells are contacted with a N-Cadherin
30 modulator, the cells would reacquire serum dependence and would release growth factors at a lower level.

Tumor specific markers levels

- [0133] Tumor cells release an increased amount of certain factors (hereinafter "tumor specific markers") than their normal counterparts. For example, plasminogen activator (PA) is released from human glioma at a higher level than from normal brain cells (*see, e.g.,*
- 5 Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*. In Mihich (ed.): "Biological Responses in Cancer." New York, Academic Press, pp. 178-184 (1985)). Similarly, tumor angiogenesis factor (TAF) is released at a higher level in tumor cells than their normal counterparts. *See, e.g.,* Folkman, *Angiogenesis and cancer*, *Sem Cancer Biol.* (1992)).
- 10 [0134] Tumor specific markers can be assayed to identify N-Cadherin modulators which decrease the level of release of these markers from host cells. Typically, transformed or tumorigenic host cells are used. Various techniques which measure the release of these factors are described in Freshney (1994), *supra*. Also, *see, Unkless et al., J. Biol. Chem.* 249:4295-4305 (1974); Strickland & Beers, *J. Biol. Chem.* 251:5694-5702 (1976); Whur *et*
- 15 *al., Br. J. Cancer* 42:305-312 (1980); Gulino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*. In Mihich, E. (ed): "Biological Responses in Cancer." New York, Plenum (1985); Freshney *Anticancer Res.* 5:111-130 (1985).

Invasiveness into Matrigel

- [0135] The degree of invasiveness into Matrigel or some other extracellular matrix
- 20 constituent can be used as an assay to identify N-Cadherin modulators which are capable of inhibiting abnormal cell proliferation and tumor growth. Tumor cells exhibit a good correlation between malignancy and invasiveness of cells into Matrigel or some other extracellular matrix constituent. In this assay, tumorigenic cells are typically used as host cells. Therefore, N-Cadherin modulators can be identified by measuring changes in the level
- 25 of invasiveness between the host cells before and after the introduction of potential modulators. If a compound modulates N-Cadherin, its expression in tumorigenic host cells would affect invasiveness.

- [0136] Techniques described in Freshney (1994), *supra*, can be used. Briefly, the level of invasion of host cells can be measured by using filters coated with Matrigel or some other
- 30 extracellular matrix constituent. Penetration into the gel, or through to the distal side of the filter, is rated as invasiveness, and rated histologically by number of cells and distance

50
 moved, or by prelabeling the cells with ^{125}I and counting the radioactivity on the distal side of the filter or bottom of the dish. See, e.g., Freshney (1984), *supra*.

Tumor growth in vivo

- [0137] Effects of N-Cadherin modulators on cell growth can be tested in transgenic or immune-suppressed mice. Knock-out transgenic mice can be made, in which the endogenous N-Cadherin gene is disrupted. Such knock-out mice can be used to study effects of N-Cadherin, e.g., as a cancer model, as a means of assaying *in vivo* for compounds that modulate N-Cadherin, and to test the effects of restoring a wild-type or mutant N-Cadherin to a knock-out mouse.
- 10 [0138] Knock-out cells and transgenic mice can be made by insertion of a marker gene or other heterologous gene into the endogenous N-Cadherin gene site in the mouse genome via homologous recombination. Such mice can also be made by substituting the endogenous N-Cadherin with a mutated version of N-Cadherin, or by mutating the endogenous N-Cadherin, e.g., by exposure to carcinogens.
- 15 [0139] A DNA construct is introduced into the nuclei of embryonic stem cells. Cells containing the newly engineered genetic lesion are injected into a host mouse embryo, which is re-implanted into a recipient female. Some of these embryos develop into chimeric mice that possess germ cells partially derived from the mutant cell line. Therefore, by breeding the chimeric mice it is possible to obtain a new line of mice containing the introduced genetic
- 20 lesion (see, e.g., Capecchi *et al.*, *Science* 244:1288 (1989)). Chimeric targeted mice can be derived according to Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) and *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987). These knock-out mice can be used as hosts to test the effects of various N-Cadherin modulators on cell
- 25 growth.
- [0140] Alternatively, various immune-suppressed or immune-deficient host animals can be used. For example, genetically athymic "nude" mouse (see, e.g., Giovanella *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 52:921 (1974)), a SCID mouse, a thymectomized mouse, or an irradiated mouse (see, e.g., Bradley *et al.*, *Br. J. Cancer* 38:263 (1978); Selby *et al.*, *Br. J. Cancer* 41:52
- 30 (1980)) can be used as a host. Transplantable tumor cells (typically about 10^6 cells) injected into isogenic hosts will produce invasive tumors in a high proportions of cases, while normal cells of similar origin will not. Hosts are treated with N-Cadherin modulators, e.g., by

injection. After a suitable length of time, preferably 4-8 weeks, tumor growth is measured (e.g., by volume or by its two largest dimensions) and compared to the control. Tumors that have statistically significant reduction (using, e.g., Student's T test) are said to have inhibited growth. Using reduction of tumor size as an assay, N-Cadherin modulators which are
5 capable, e.g., of inhibiting abnormal cell proliferation can be identified.

Screening Methods

[0141] The present invention also provides methods of identifying compounds that inhibit the binding of a N-Cadherin protein, respectively, to a N-Cadherin receptor, wherein said compounds find use in inhibiting the growth of and promoting the regression of a tumor that
10 expresses N-Cadherin protein, for example a urogenital cancer tumor, including a prostate or bladder cancer tumor.

[0142] Using the assays described herein, one can identify lead compounds that are suitable for further testing to identify those that are therapeutically effective modulating agents by screening a variety of compounds and mixtures of compounds for their ability to decrease,
15 inhibit the binding of a N-Cadherin protein, respectively, to a N-Cadherin receptor. Compounds of interest can be either synthetic or naturally occurring.

[0143] Screening assays can be carried out *in vitro* or *in vivo*. Typically, initial screening assays are carried out *in vitro*, and can be confirmed *in vivo* using cell based assays or animal models. For instance, proteins of the regenerating gene family are involved with cell
20 proliferation. Therefore, compounds that inhibit the binding of a N-Cadherin protein, respectively, to a N-Cadherin receptor can inhibit cell proliferation resulting from this binding interaction in comparison to cells unexposed to a test compound. Also, the binding of a N-Cadherin protein, respectively, to a N-Cadherin receptor is involved with tissue injury responses, inflammation, and dysplasia. In animal models, compounds that inhibit the
25 binding of a N-Cadherin protein, respectively, to its receptor can, for example, inhibit wound healing or the progression of dysplasia in comparison to an animal unexposed to a test compound. See, for example, Zhang, et al., *World J Gastroenter* (2003) 9:2635-41.

[0144] Usually a compound that inhibits the binding of N-Cadherin, respectively, to a N-cadherin receptor is synthetic. The screening methods are designed to screen large chemical
30 libraries by automating the assay steps and providing compounds from any convenient source to assays, which are typically run in parallel (e.g., in microtiter formats on microtiter plates in robotic assays).

[0145] The invention provides *in vitro* assays for inhibiting N-Cadherin binding to its receptor in a high throughput format. For each of the assay formats described, “no modulator” control reactions which do not include a modulator provide a background level of N-Cadherin binding interaction to its receptor or receptors. In the high throughput assays of the invention, it is possible to screen up to several thousand different modulators in a single day. In particular, each well of a microtiter plate can be used to run a separate assay against a selected potential modulator, or, if concentration or incubation time effects are to be observed, every 5-10 wells can test a single modulator. Thus, a single standard microtiter plate can assay about 100 (96) modulators. If 1536 well plates are used, then a single plate can easily assay from about 100- about 1500 different compounds. It is possible to assay many different plates per day; assay screens for up to about 6,000-20,000, and even up to about 100,000-1,000,000 different compounds is possible using the integrated systems of the invention. The steps of labeling, addition of reagents, fluid changes, and detection are compatible with full automation, for instance using programmable robotic systems or “integrated systems” commercially available, for example, through BioTX Automation, Conroe, TX; Qiagen, Valencia, CA; Beckman Coulter, Fullerton, CA; and Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA.

[0146] Essentially any chemical compound can be tested as a potential inhibitor of N-Cadherin binding to its receptor for use in the methods of the invention. Most preferred are generally compounds that can be dissolved in aqueous or organic (especially DMSO-based) solutions are used. It will be appreciated that there are many suppliers of chemical compounds, including Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland), as well as providers of small organic molecule and peptide libraries ready for screening, including Chembridge Corp. (San Diego, CA), Discovery Partners International (San Diego, CA), Triad Therapeutics (San Diego, CA), Nanosyn (Menlo Park, CA), Affymax (Palo Alto, CA), ComGenex (South San Francisco, CA), and Tripos, Inc. (St. Louis, MO).

[0147] In one preferred embodiment, inhibitors of the N-Cadherin receptor binding interaction are identified by screening a combinatorial library containing a large number of potential therapeutic compounds (potential modulator compounds). Such “combinatorial chemical or peptide libraries” can be screened in one or more assays, as described herein, to identify those library members (particular chemical species or subclasses) that display a

desired characteristic activity. The compounds thus identified can serve as conventional "lead compounds" or can themselves be used as potential or actual therapeutics.

- [0148] A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds generated by either chemical synthesis or biological synthesis, by combining a number of chemical "building blocks" such as reagents. For example, a linear combinatorial chemical library such as a polypeptide library is formed by combining a set of chemical building blocks (amino acids) in every possible way for a given compound length (*i.e.*, the number of amino acids in a polypeptide compound). Millions of chemical compounds can be synthesized through such combinatorial mixing of chemical building blocks.
- [0149] Preparation and screening of combinatorial chemical libraries is well known to those of skill in the art. Such combinatorial chemical libraries include, but are not limited to, peptide libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,010,175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493 (1991) and Houghton *et al.*, *Nature* 354:84-88 (1991)). Other chemistries for generating chemical diversity libraries can also be used. Such chemistries include, but are not limited to: peptoids (PCT Publication No. WO 91/19735), encoded peptides (PCT Publication WO 93/20242), random bio-oligomers (PCT Publication No. WO 92/00091), benzodiazepines (U.S. Pat. No. 5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993)), vinylogous polypeptides (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), nonpeptidal peptidomimetics with β -D-glucose scaffolding (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)), oligocarbamates (Cho *et al.*, *Science* 261:1303 (1993)), and/or peptidyl phosphonates (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), nucleic acid libraries (*see*, Ausubel, Berger and Sambrook, *all supra*), peptide nucleic acid libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,539,083), antibody libraries (*see, e.g.*, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) and PCT/US96/10287), carbohydrate libraries (*see, e.g.*, Liang *et al.*, *Science*, 274:1520-1522 (1996) and U.S. Patent 5,593,853), small organic molecule libraries (*see, e.g.*, benzodiazepines, Baum C&EN, Jan 18, page 33 (1993); isoprenoids, U.S. Patent 5,569,588; thiazolidinones and metathiazanones, U.S. Patent 5,549,974; pyrrolidines, U.S. Patents 5,525,735 and 5,519,134; morpholino compounds, U.S. Patent 5,506,337; benzodiazepines, 5,288,514, and the like).

[0150] Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available (see, e.g., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

5 *siRNA technology*

[0151] The design and making of siRNA molecules and vectors are well known to those of ordinary skill in the art. For instance, an efficient process for designing a suitable siRNA is to start at the AUG start codon of the mRNA transcript (eg., see, Figures 7, 8, 9) and scan for AA dinucleotide sequences (see, Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888 (2001). Each AA and the 3' adjacent nucleotides are potential siRNA target sites. The length of the adjacent site sequence will determine the length of the siRNA. For instance, 19 adjacent sites would give a 21 Nucleotide long siRNA. siRNAs with 3' overhanging UU dinucleotides are often the most effective. This approach is also compatible with using RNA pol III to transcribe hairpin siRNAs. RNA pol III terminates transcription at 4-6 nucleotide poly(T) tracts to create RNA molecules having a short poly(U) tail. However, siRNAs with other 3' terminal dinucleotide overhangs can also effectively induce RNAi and the sequence may be empirically selected. For selectivity, target sequences with more than 16-17 contiguous base pairs of homology to other coding sequences can be avoided by conducting a BLAST search (see, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

20 [0152] The siRNA expression vectors to induce RNAi can have different design criteria. A vector can have inserted two inverted repeats separated by a short spacer sequence and ending with a string of T's which serve to terminate transcription. The expressed RNA transcript is predicted to fold into a short hairpin siRNA. The selection of siRNA target sequence, the length of the inverted repeats that encode the stem of a putative hairpin, the order of the inverted repeats, the length and composition of the spacer sequence that encodes the loop of the hairpin, and the presence or absence of 5'-overhangs, can vary. A preferred order of the siRNA expression cassette is sense strand, short spacer, and antisense strand. Hairp siRNAs with these various stem lengths (e.g., 15 to 30) can be suitable. The length of the loops linking sense and antisense strands of the hairpin siRNA can have varying lengths (e.g., 3 to 9 nucleotides, or longer). The vectors may contain promoters and expression enhancers or other regulatory elements which are operably linked to the nucleotide sequence encoding the siRNA. These control elements may be designed to allow the clinician to turn

off or on the expression of the gene by adding or controlling external factors to which the regulatory elements are responsive.

[0153] In some embodiments, the invention provides a method for inhibiting the growth of a cancer cell expressing a N-Cadherin protein by contacting the cancer cell with an antibody or fragment thereof that recognized and binds the protein in an amount effective to inhibit the growth of the cancer cell. In some embodiments, the cancer cell is a prostate cancer cell or a bladder cancer cell. The contacting antibody can be a monoclonal antibody and/or a chimeric antibody. In some embodiments, the chimeric antibody comprises a human immunoglobulin constant region. In some embodiments, the antibody is a human antibody or comprises a human immunoglobulin constant region. In further embodiments, the antibody fragment comprises an Fab, F(ab)₂, or Fv. In other embodiments, the fragment comprises a recombinant protein having an antigen-binding region. In yet other embodiments, the antibody or the fragment is an immunoconjugate comprising the antibody or the fragment linked to a therapeutic agent. The therapeutic agent can be cytotoxic agent. The cytotoxic agent can be selected from a group consisting of ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, arbrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin mitogellin, retstrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, croton, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor, maytansinoids, and glucocorticoidricin. The therapeutic agent can be a radioactive isotope. The therapeutic isotope can be selected from the group consisting of ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁹⁰Y and ¹⁸⁶Re. In any of the embodiments above, a chemotherapeutic drug and/or radiation therapy can be administered further. In some embodiments, the patient also receives hormone antagonist therapy. The contacting of the patient with the antibody or antibody fragment, can be by administering the antibody to the patient intravenously, intraperitoneally, intramuscularly, intratumorally, or intradermally. In some embodiments, the patient has a urogenital cancer (e.g., bladder cancer, prostate cancer). In some embodiments of the above, the patient suffers from prostate cancer and optionally further receives patient hormone ablation therapy. In some embodiments, the contacting comprises administering the antibody directly into the cancer or a metastasis of the cancer.

[0154] In some embodiments, the immunoconjugate has a cytotoxic agent which is a small molecule. Toxins such as maytansin, maytansinoids, saporin, gelonin, ricin or calicheamicin and analogs or derivatives thereof are also suitable.. Other cytotoxic agents that can be

56

conjugated to the N-cadherin antibodies include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil. Enzymatically active toxins and fragments thereof can also be used. The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways (e.g., bifunctional linkers, fusion proteins). The antibodies of the present invention may also be conjugated to an enzyme which converts a prodrug to an active chemotherapeutic agent. See, WO 88/07378 and U. S. Patent No. 4,975, 278. The antibody or immunoconjugate may optionally be linked to nonprotein polymers (e. g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol).

[0155] The compositions for administration will commonly comprise an agent as described herein dissolved in a pharmaceutically acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., buffered saline and the like. These solutions are sterile and generally free of undesirable matter. These compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sodium lactate and the like. The concentration of active agent in these formulations can vary widely, and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, body weight and the like in accordance with the particular mode of administration selected and the patient's needs.

[0188] Thus, a typical pharmaceutical composition for intravenous administration may provide from about 0.1 to 100 mg per patient per day. Dosages from 0.1 up to about 100 mg per patient per day may be used. Substantially higher dosages are possible in topical administration. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in such publications as Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[0189] The pharmaceutical compositions can be administered in a variety of unit dosage forms depending upon the method of administration. For example, unit dosage forms suitable for oral administration include, but are not limited to, powder, tablets, pills, capsules and lozenges. It is recognized that antibodies when administered orally, should be protected from digestion. This is typically accomplished either by complexing the molecules with a composition to render them resistant to acidic and enzymatic hydrolysis, or by packaging the

molecules in an appropriately resistant carrier, such as a liposome or a protection barrier. Means of protecting agents from digestion are well known in the art.

[0156] Pharmaceutical formulations, particularly, of the antibodies and immunoconjugates and inhibitors for use with the present invention can be prepared by mixing an antibody
5 having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers. Such formulations can be lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations used. Acceptable carriers, excipients or stabilizers can be acetate, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants (e.g., ascorbic acid) preservatives
10 low molecular weight polypeptides; proteins, such as serum albumin or gelatin, or hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; and amino acids, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents; and ionic and non-ionic surfactants (e.g., polysorbate); salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e. g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants.
15 The antibody can be formulated at a concentration of between 0.5 - 200 mg/ml, or between 10-50 mg/ml.

[0157] The formulation may also provide additional active compounds, including, chemotherapeutic agents, cytotoxic agents, cytokines, growth inhibitory agent, and anti-hormonal agent. The active ingredients may also prepared as sustained-release preparations
20 (e.g., semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers (e.g., polyesters, hydrogels (for example, poly (2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly (vinylalcohol)), polylactides. The antibodies and immunoconjugates may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin microcapsules and poly- (methylmethacrylate)
25 microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions.

[0190] The compositions containing the inhibitors and agents of the invention (e.g., antibodies) can be administered for therapeutic or prophylactic treatments. In therapeutic
30 applications, compositions are administered to a patient suffering from a disease (e.g., cancer) in a "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's health. Single or multiple

administrations of the compositions may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the patient. A "patient" or "subject" for the purposes of the present invention includes both humans and other animals, particularly mammals. Thus the methods are applicable to both human therapy and veterinary applications. In the preferred embodiment the patient is a mammal, preferably a primate, and in the most preferred embodiment the patient is human. Other known cancer therapies can be used in combination with the methods of the invention. For example, inhibitors of Wnt signaling may also be used to target or sensitize a cell to other cancer therapeutic agents such as 5FU, vinblastine, actinomycin D, cisplatin, methotrexate, and the like. In other embodiments, the methods of the invention can be used with radiation therapy and the like.

EXAMPLES

[0158] The following examples are offered to illustrate, but not limit the claimed invention.

Example 1.

[0159] The data in Figure 1 show that even though N-cadherin is expressed in only a small subset of the androgen independent cells, that treatment with antibody is sufficient to delay to growth and progression of the androgen independent tumors (pink and yellow curves). These data suggest that the N-cadherin population of cells is required for androgen independent tumor formation, and that blocking it is sufficient to delay tumor progression. These data are consistent with an interpretation that N-cadherin marks a population of androgen independent stem cells. Blocking growth of the stem cells is enough to block growth of the tumor. These data also show that antibodies may work on cells that express normal or even low levels of N-cadherin.

[0160] As shown in Figure 2, cells were injected into castrate mice, and the N-cadherin positive cells formed tumors more quickly and efficiently than the negative population, suggesting that N-cadherin positive cells are either have a growth advantage, or that they have stem cell characteristics and are more tumorigenic than the negative population. Unsorted cells grow similar to the N-cadherin positive cells.

[0161] As shown in Figures 3 and 4, tumors from 100% N-cad positive cells are only 41.25% positive for N-cadherin, suggesting that these cells give rise to N-cadherin null cells. This is consistent with the hypothesis that N-cadherin positive cells are stem cells that can

give rise to more differentiated, N-cadherin negative cells. Meanwhile, the N-cadherin negative population gives rise to tumors that are 9% N-cadherin positive, similar to the unsorted cells. This suggests that growth of these cells requires that a stem-like population acquire or upregulated N-cadherin in order to form androgen independent tumors. The delay
5 in tumorigenicity is caused by the requirement for N-cadherin to give rise to androgen independent tumors.

[0162] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of
10 this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

1 WHAT IS CLAIMED IS:

- 2 1. A method of treating a cancer patient, comprising the steps of:
- 3 (a) obtaining a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer
- 4 that expresses a N-cadherin protein;
- 5 (b) determining the presence or absence or amount of the N-cadherin protein
- 6 in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to
- 7 be negative for the cancer; thereby diagnosing said cancer that expresses a N-cadherin
- 8 protein, wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is expressed
- 9 by a subset of cells, and wherein the N-cadherin protein is not overexpressed; and
- 10 (c) administering an effective amount of N-cadherin antibody or fragment
- 11 thereof to the individual at risk of having a cancer that expresses a N-Cadherin protein.
- 1 2. The method of claim 1, wherein said tissue sample is prostate or
- 2 bladder tissue.
- 1 3. The method of claim 1, wherein said cancer is a prostate cancer.
- 1 4. The method of claim 1, wherein said cancer is a bladder cancer.
- 1 5. The method of claim 1, wherein said cancer is a hormone refractory
- 2 prostate cancer.
- 1 6. The method of claim 1, wherein said cancer is a metastatic cancer.
- 1 7. The method of claim 1, wherein said antibody is a monoclonal
- 2 antibody.
- 1 8. The method of claim 1, wherein the fragment is a scFv.
- 1 9. The method of claim 1, wherein the fragment is a diabody.
- 1 10. The method of claim 1, wherein said antibody blocks hormone
- 2 refractory prostate cancer.
- 1 11. The method of claim 1, wherein said antibody blocks cancer stem
- 2 cells.
- 1 12. A method of identifying cancer stem cells, comprising the steps of:

2 (a) obtaining a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer
3 that expresses a N-cadherin protein;
4 (b) determining the presence or absence of cancer stem cells in the test tissue
5 sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for
6 the cancer; wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is
7 expressed by a subset of the stem cells and is not overexpressed.

1 13 The method of claim 12, wherein said tissue sample is prostate or
2 bladder tissue.

1 14. The method of claim 12, wherein said cancer is a prostate cancer.

1 15. The method of claim 12, wherein said cancer is a bladder cancer.

1 16. The method of claim 12, wherein said cancer is a hormone refractory
2 prostate cancer.

1 17. The method of claim 12, wherein said cancer is a metastatic cancer.

Fig. 1a

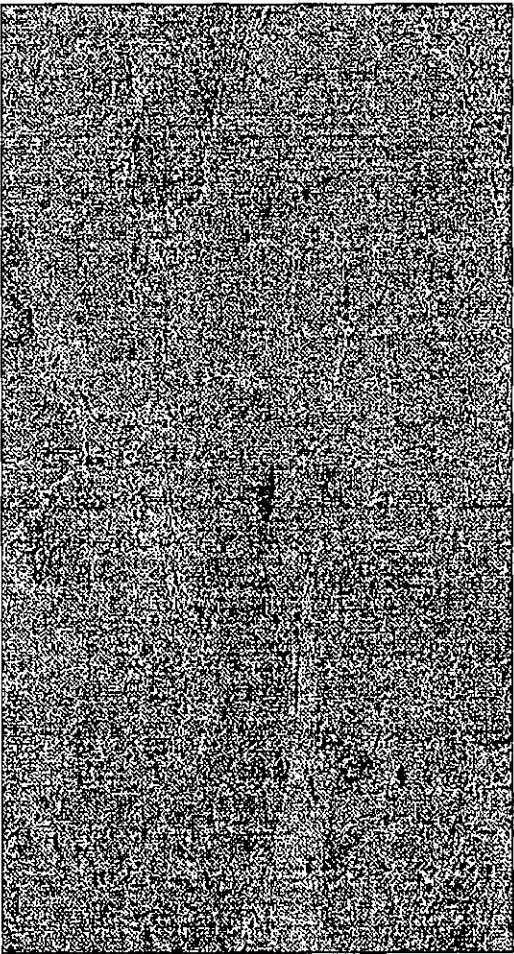
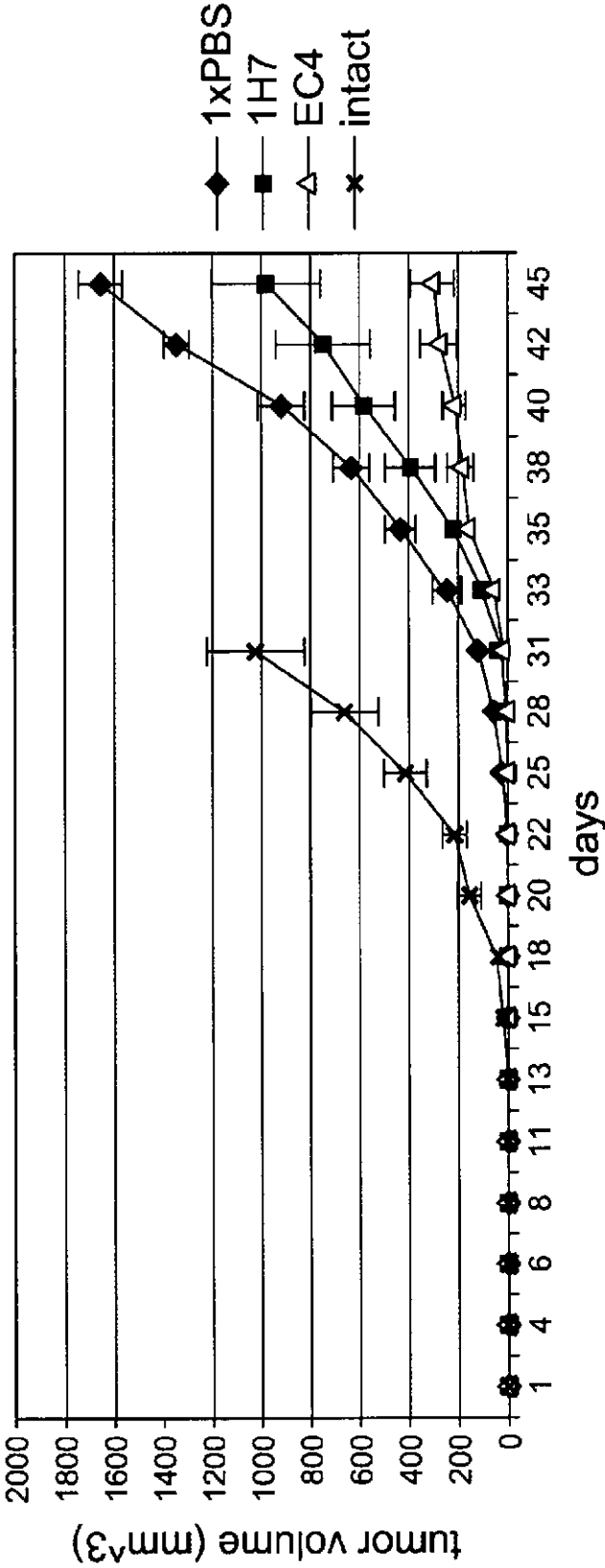


Fig. 1b
LAPC9AD to AI transition: 1xPBS vs 1H7 vs EC4



3/16

Fig. 2
Tumor Growth Curve of LAPC9Al sort
LAPC9Al sorted in castrated SCIDs

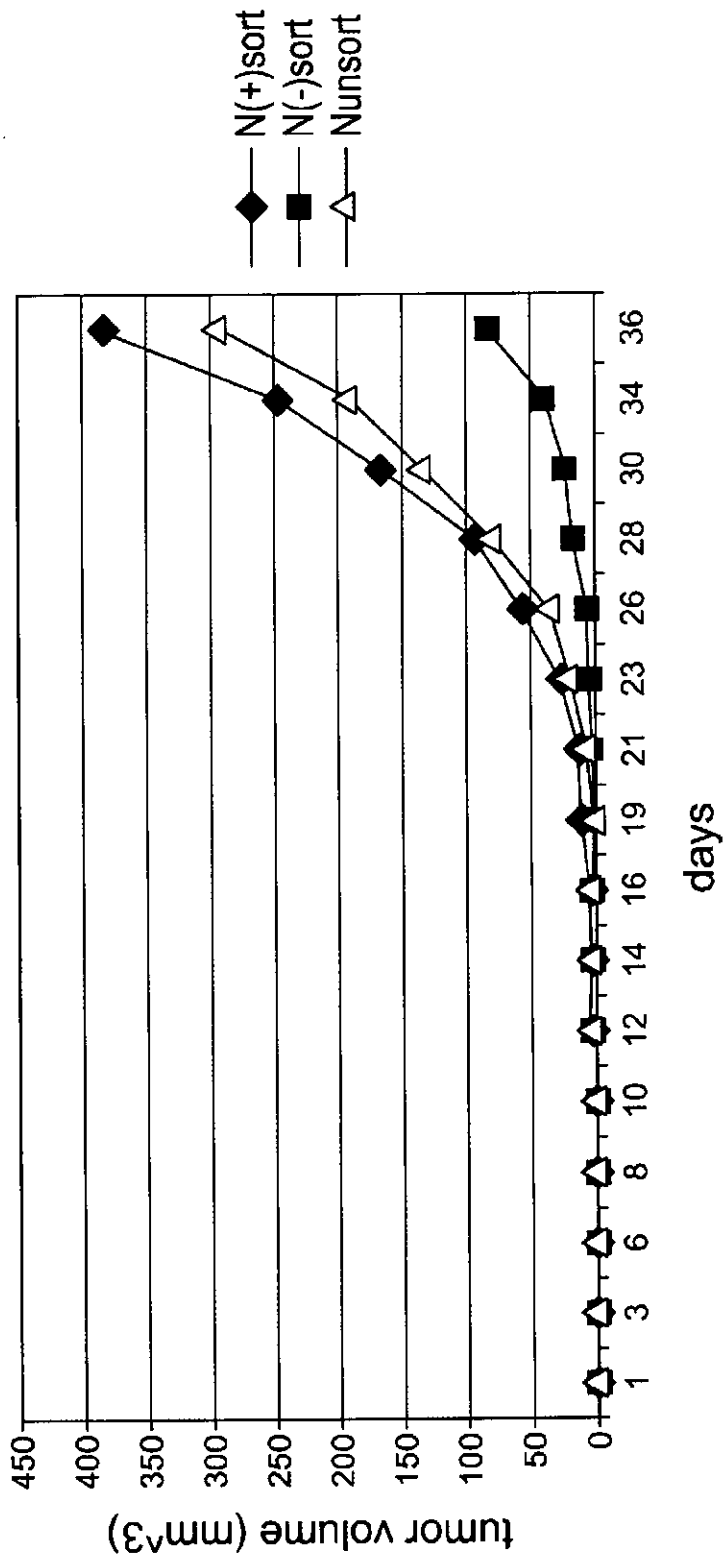


Fig. 3 (Sheet 1)
FACSs results on processed N-cad sorted tumors
un2-neg cont.007

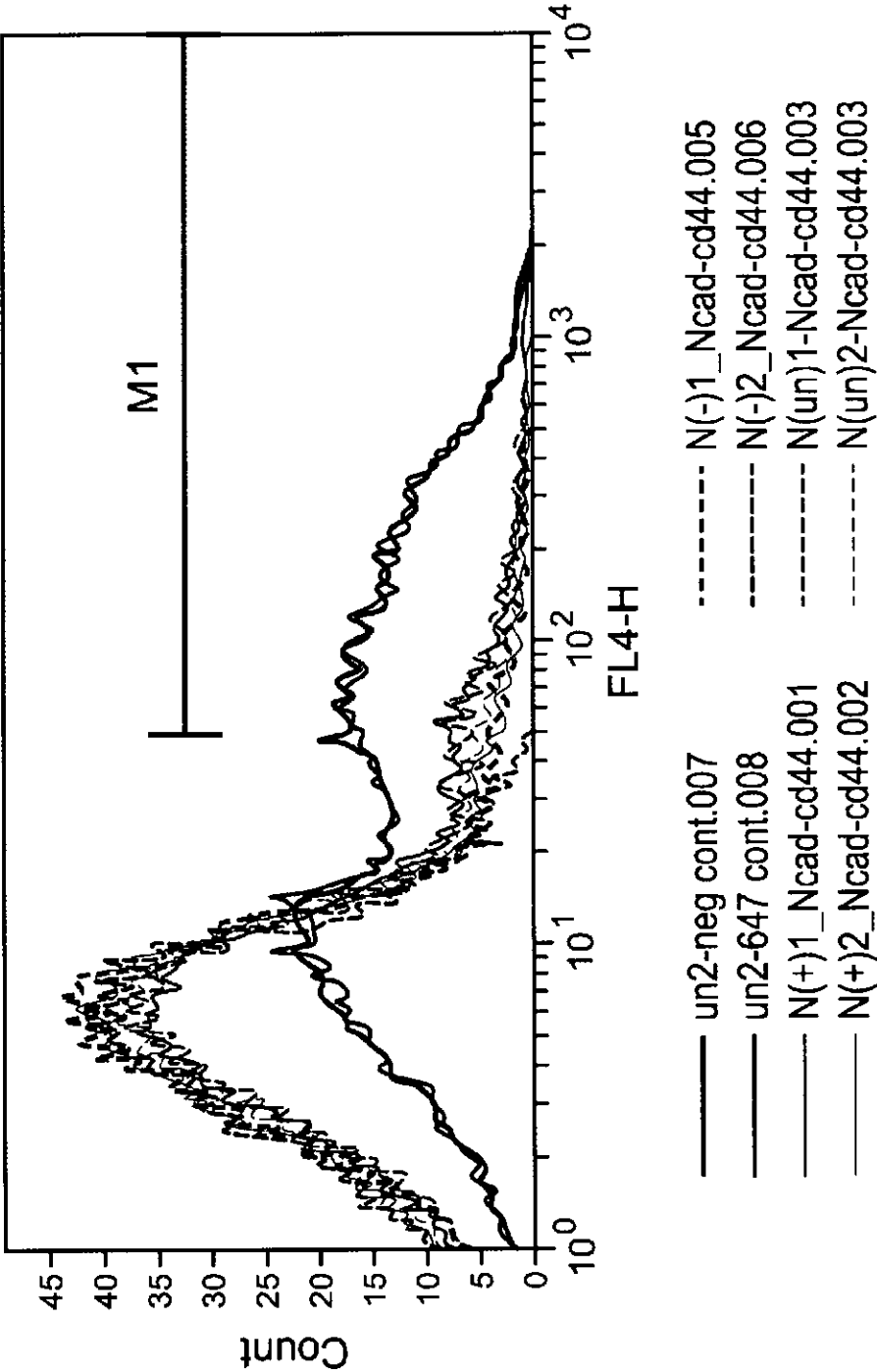


Fig. 3 (Sheet 2)

FCS Filename	Parameter	Marker	% of Gated Cells
un2-neg cont.007	FL4-H	None	100.0
un2-neg cont.007	FL4-H	1	0.19
un2-647 cont.008	FL4-H	None	100.0
un2-647 cont.008	FL4-H	1	3.32
N(+)1_Ncad cd44.001	FL4-H	None	100.0
N(+)1_Ncad cd44.001	FL4-H	1	41.72
N(+)2_Ncad cd44.002	FL4-H	None	100.0
N(+)2_Ncad cd44.002	FL4-H	1	40.78
N(-)1_Ncad cd44.005	FL4-H	None	100.0
N(-)1_Ncad cd44.005	FL4-H	1	8.7
N(-)2_Ncad cd44.006	FL4-H	None	100.0
N(-)2_Ncad cd44.006	FL4-H	1	8.46
N(un)1_Ncad cd44.003	FL4-H	None	100.0
N(un)1_Ncad cd44.003	FL4-H	1	10.27
N(un)2_Ncad cd44.004	FL4-H	None	100.0
N(un)2_Ncad cd44.004	FL4-H	1	9.62

5/16

Ave%

Ncad(+)sort 41.25%

Ncad(-)sort 8.58%

Ncad unsort 9.95%

Fig. 4

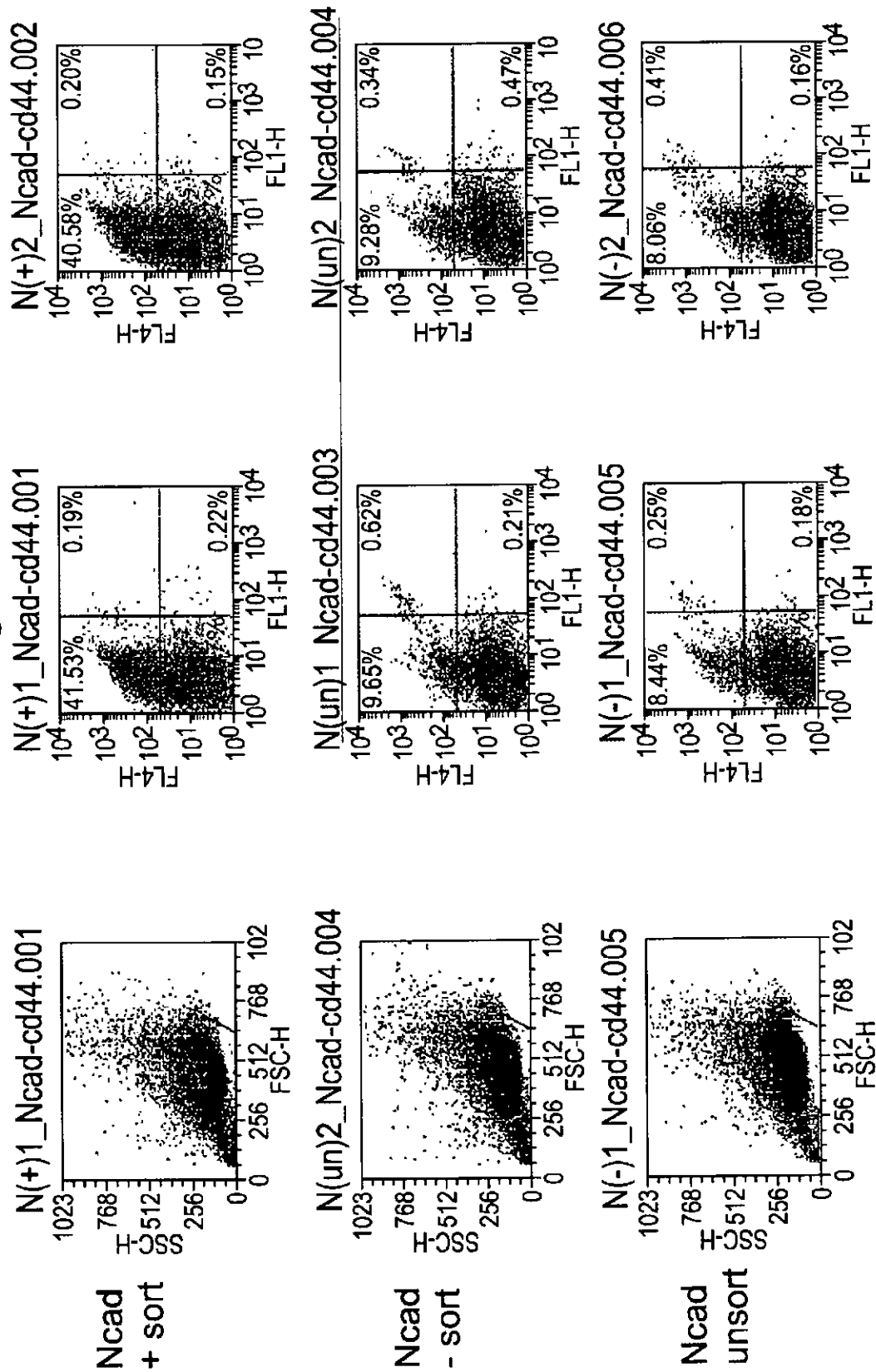


Fig. 5 (Sheet 1)

Human N-Caderin Protein Sequence Information

1	mcriaga	l	r	t	l	p	l	a	a	l	l	q	a	s	v	e	a	s	g	e	i	a	l	c	k	t	g	f	p	e	d	v	y	s	a	v	l	s	k	d	v	h	e	g	g	p	l	l	n	v	k	f	s							
61	ncngkr	k	r	k	v	q	y	e	s	s	e	p	a	d	f	k	v	d	e	d	g	m	v	y	a	v	r	s	f	p	l	s	s	e	h	a	k	f	l	i	y	a	q	d	k	e	t	g	e	k	w	g	v	a	v	k	l			
121	slkptl	t	e	e	s	v	k	e	s	a	e	v	e	e	i	v	f	p	r	q	f	s	k	h	s	g	h	l	q	r	q	k	r	d	w	v	i	p	p	i	n	l	p	e	n	s	r	g	p	f	p	q	e	l	v					
181	ri	r	s	d	r	d	k	n	l	s	l	r	y	s	v	t	g	p	a	d	g	p	p	t	g	i	f	i	i	n	p	i	s	g	q	l	s	v	t	k	p	l	d	r	e	q	i	a	r	f	h	l	r	a	h	a	v			
241	ingnq	v	e	n	p	i	d	i	v	i	n	v	i	d	m	n	d	n	r	p	e	f	l	h	q	v	w	n	g	t	v	p	e	g	s	k	p	g	t	y	v	m	t	v	t	a	i	d	a	d	p	n	a	l	n					
301	gm	l	r	y	r	i	v	s	q	a	p	s	t	p	s	p	n	m	f	t	i	n	n	e	t	g	d	i	i	t	v	a	a	g	l	d	r	e	k	v	q	q	y	t	l	i	i	q	a	t	d	m	e	g	n	p	t	y	g	
361	l	s	n	t	a	t	a	v	i	t	v	t	d	v	n	d	n	p	p	e	f	t	a	m	t	f	y	g	e	v	p	e	n	r	v	d	i	i	v	a	n	l	t	v	t	d	k	d	q	p	h	t	p	a	w	n	a	v	y	r
421	i	s	g	g	d	p	t	g	r	f	a	i	q	t	d	p	n	s	n	d	g	l	v	t	v	k	p	i	d	f	e	t	n	r	m	f	v	l	t	v	a	a	e	n	q	v	p	l	a	k	g	i	q	h	p	p	q	s	t	
481	at	v	s	v	t	v	i	d	v	n	w	l	k	i	d	p	v	n	g	q	i	t	t	i	a	v	l	d	r	e	s	p	n	v	k	n	n	i	y	n	a	t	f	l	a	s	d	n	g	i	p	p	m	s	g	t	g	t	l	
541	n	w	l	k	i	d	p	v	n	g	a	p	q	v	l	p	q	e	a	e	a	g	l	n	i	k	i	k	f	l	t	g	a	i	i	a	i	l	l	c	i	i	l	i	l	v	l	m	w	t	i	t	r	l	n	g	d	f		
601	a	p	q	v	l	p	q	e	a	e	a	g	l	n	i	k	i	k	f	l	t	g	a	i	i	a	i	l	l	c	i	i	l	i	l	v	l	m	q	p	d	t	v	e	p	d	a	i	k	p	v	g	i	r	r	m	d	e		
661	a	g	l	n	i	k	i	k	f	l	t	g	a	i	i	a	i	l	l	c	i	i	l	i	l	v	l	m	q	p	d	t	v	e	p	d	a	i	k	p	v	g	i	r	r	m	d	e	r	p	i	h	a	e	p	q	y	p		
721	t	g	a	i	i	a	i	l	l	c	i	i	l	i	l	v	l	m	q	p	d	t	v	e	p	d	a	i	k	p	v	g	i	r	r	m	d	e	r	p	i	h	a	e	p	q	y	p	s	l	n	s	s	s	s	g	g	e		
781	d	q	d	y	d	l	s	q	l	q	q	p	d	t	v	e	p	d	a	i	k	p	v	g	i	r	r	m	d	e	r	p	i	h	a	e	p	q	y	p	s	l	n	s	s	s	s	g	g	e	q	d	y	d	l	n	d	w	g	
841	a	a	d	n	d	p	t	a	p	p	y	d	s	l	l	v	f	d	y	e	g	s	g	t	l	g	s	l	s	s	s	s	s	g	g	e	q	d	y	d	l	n	d	w	g	p	r	f	k	k	l	a	d	m	y					
901	g	g	g	d	d																																																							

Fig. 5 (Sheet 2)

mRNA

ORIGIN

1 atgtgccgga tagcgggagc gctgcggacc ctgccgctgc tggcggccct gcttcaggcg
61 tctgtagagg cttctggtga aatcgcatga gatttcctga agaggtttac
121 agtgcagtct tatcgaagga tgtgcatgaa ggacagcctc ttctcaatgt gaagtttagc
181 aactgcaatg gaaaagaaa agtacaatat gagagcagtg agcctgcaga ttttaagggtg
241 gatgaagatg gcatgggtga tgccgtgaga agctttccac tctcttctga gcatgccaag
301 ttcctgatat atgcccaaga caaagagacc caggaaaagt ggcaagtggc agtaaaatg
361 agcctgaagc caaccttaac tgaggagtca gtgaaggagt cagcagaagt tgaagaaata
421 gtgttcccaa gacaattcag taagcacagt ggccacctac aaaggcagaa gagagactgg
481 gtcatccctc caatcaactt gccagaaaac tccaggggac cttttcctca agagcttgtc
541 aggatcaggt ctgatataga taaaacctt tcactgcggt acagtgtaac tgggccagga
601 gctgaccagc ctccaactgg tatcttcatt atcaacccca tctcgggtca gctgtcggtg
661 acaaagcccc tggatcgcgga gcagatagcc cggtttcatt tgagggcaca tgcagtagat
721 attaatggaa atcaagtggg gaaccccat gacattgtca tcaatgttat tgacatgaat
781 gacaacagac ctgagttctt acaccagggt tggaatggga cagttcctga gggatcaaag
841 cctggaacat atgtgatgac cgtaacagca attgatgctg acgatcccaa tgcctcaat
901 gggatgttga ggtacagaat cgtgtctcag gctccaagca ccccttcacc caacatgttt
961 acaatcaaca atgagactgg tgacatcatc acagtggcag ctggacttga tcgagaaaaa
1021 gtgcaacagt atacgttaat aattcaagct acagacatgg aaggcaatcc cacatatggc

Fig. 5 (Sheet 3)

1081 ctttcaaaca cagccacggc cgtcatcaca gtgacagatg tcaatgacaa tcctccagag
1141 tttagtgcca tgacgtttta tggtagagtt cctgagaaca gggtagacat catagtagct
1201 aatctaactg tgaccgataa ggatcaaccc catacaccag cctggaacgc agtgtacaga
1261 atcagtggcg gagatcctac tggacggttc gccatccaga cgaacccaaa cagcaacgac
1321 gggtagtca ccgtggtcaa accaatcgac tttgaaacaa ataggatgtt tgtccttact
1381 gttgctgcag aaaatcaagt gccattagcc aaggaattc agcaccgcc tcagtcaact
1441 gcaaccgtgt ctgttacagt tattgacgta aatgaaaacc cttattttgc cccaatcct
1501 aagatcattc gccagaaga atcgatatat gcagcaaat attagataca tttgacaac attcactgct
1561 caggaccagc aatagatcc tgtgaatgga caataaacta caattgctgt tttggaccga
1621 aattggctaa aaatagatcc caatatatat aatgctactt tccttgcttc tgacaatgga
1681 gaatcaccaa atgtgaaaaa aggaacgctg cagatctatt tacttgatat taatgacaat
1741 attcctccta tgagtggaa caggtaccca agaggcagag acttgcgaaa ctccagacc caattcaatt
1801 gcccctcaag tcttgattta taagagaaat tggaccatca ctgggcttaa tggtagatttt
1861 aatattacag cacttgatta tgacattgat ccaaatgctg gaccatttgc ttttgatctt
1921 cctttatctc cagtgaactat taagagaaat tggaccatca ctgggcttaa tggtagatttt
1981 gctcagctta atttaaatcc tcccaaatca aatatttcca tctatgaagt tcccatcata
2041 atcacagatt cgggtaattcc ctgcaaatca aatatttcca tctatgaagt tcccatcata
2101 cagtgtgact ccaacgggga ctgcaaatca aatatttcca tctatgaagt tcccatcata
2161 accggtgcca tcattgccat cctgctctgc atcatcatcc tgccttatcct tgtgctgatg
2221 tttgtggtat ggaatgaaacg gcgggataaa gaacgccagg ccaacaact ttttaattgat
2281 ccagaagatg atgtaagaga taatatatta aatatgatg aagaaggttg aggagaagaa

Fig. 5 (Sheet 4)

2341 gaccaggact atgacttgag ccagctgcag cagcctgaca ctgtggagcc tgatgccatc
2401 aagcctgtgg gaatccgacg aatggatgaa agaccatccc acgctgagcc ccagtatccg
2461 gtccgatctg cagccccaca ccctggagac attggggact tcattaatga gggccttaaa
2521 gcggctgaca atgaccccac agctccacca tatgactccc tgtagtggt tgaactatgaa
2581 ggcagtggtt ccacctggg gtccttgagc tcccttaatt cctcaagtag tggtggtgag
2641 caggactatg attacctgaa cgactggggg ccacgggttca agaaacttgc tgacatgtat
2701 ggtggagggtg atgactga

Fig. 5 (Sheet 5)

translation = "MCRIAGALRTLPLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDEVYSAVL
SKDVHEGQPLLNVKFSNCNGKRKVQYESSSEPADFKVDEDEGMVYAVRSFPLSSEHAKFL
IYAQDKETQEKWQAVKLSLKPTLTEESVKESAEEVEIVFPRQFSKHSGLQRQKRDW
VIPPINLPENSRGPFPPQELVIRSDRDKNLSLRYSVTGPQADQPPTGIFIINPISGQL
SVTKPLDREQIARFHLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEFLHQVWNGTVP
EGSKPGTYVMTVTAIDADDPNALNGMLRYRIVSQAPSTSPNMF TINNETGDIITVAA
GLDREKVQYTLIIQATDMEGNPTYGLSNTATAVITVTDVNDNPPEFTAMTFYGEVPE
NRVDIIIVANLTVTDKQPHTPAWNNAVYRISGGDPTGRFAIQTDPNNDGLVTVVKPID
FETNRMFVLTVAAENQVPLAKGIQHPPQSTATVSVTIDVNENPYFAPNPKIIRQEEG
LHAGTMLTTFTAQDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTTIAVLDRSPNVK
NNIYNATFLASDNGIPPMMSGTGLQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETPDPSINITA
LDYDIDPNAGPFAFDLPLSPVTIKRWNWTITRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIIT
DSGNPPKSNISILRVKVCQCDSDNGDCTDVDRIVGAGLGTGAI IAILLCIILLILVLM
FVVMKRRDKERQAKQLLIDPEDDVRDNI LKYDEEGGGEEDQDYDLSQLQQPDTVEPD
AIKPVGIRRMDERPIHAEPQYPVRSAAHPGDIGDFINEGLKAADNDPTAPPYDSLLV
FDYEGSGSTLGSLSSLNSSSGGEQDYDYLNDWGPRFKKLADMYGGGDD"

Fig. 6 (Sheet 1)

N-Cadherin variant sequence and antibody binding information

LOCUS NM_001792 4122 bp mRNA linear
DEFINITION Homo sapiens cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)(CDH2), mRNA

CDS 206..2926

MCRIAGALRTLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDEVYSAVLSKDVHEGQPLLNVK
FSNCNGKRKVQYESSEPADFKVDEDEGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQVAVK
LSLKPTLTEESVKESAEEIVFPRQFSKSHGLRQKRQDWVIPPINLPENSRGPPQELV
RIRSDRDKNLSLRYSVTGPADQPPTGIFIINPIISGQLSVTKPLDREQIARFHLRAHAV
DINGNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEFLHQWNGTVPEGSKPGTYVMTVTAIDADDPNALNGM
LRYRIVSQAPSTSPNMF TINNETGDIITVAAGLDREKVQQTLLIIQATDMEGNPTYGLS
NTATAVITVTDVNDNPPEFTAMTFYGEVPEPNRVDIIVANLTVTDKQDPHTPAWNAVYRI
SGGDPTRFAIQTDPNNSNDGLVTVVKPIDFETNRMFVLTVAENQVPLAKGIQHPQST
ATVSVTVIDVNPYFAPNPKIIRQEEGLHAGTMLTTFTAQDPDRYMQQNIRYTKLSDPA
NWLKIDPVNGQITTIIVLDRESPNVKNNIYNATFLASDNGIPMSGTGLQIYLLDIND
NAPQVLPQEAETCETPDPN SINI TALDYDIDPNAGPFAFDLPLSPVTIKRNWTITRLNG
DFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIITDSGNPPKSNISILRVKVCQCD SNGDCTDVDRIVGA
GLGTGAIITAILLCIIILLVLMFVWMKRRDKERQAKQLLIDPEDDV RDN ILKYDEEGG
GEEDQDYDLSQLQQPD TVEPDAIKPVGIRRMDERPIHAE PQYPVRS AAPHPGDIGDFIN
EGLKAADNDPTAPPYDSL LVFDYEGSGTAGSLSSLN SSSSGGEQDYDYLNDWGP R FKK
LADMYGGGDD

Fig. 6 (Sheet 2)

Binding sites of antibodies: Ncad 1H7, 2B3, 1F12 - 21-425aa ;

1 tttgtcatca gctcgctctc cattggcggg gagcggagag cagcgaagaa gggggtgggg
61 aggggagggg aaggaaggg ggtgaaact gcctggagcc gttctccgc gccgctgttg
121 gtgctgccgc tgcctctcc tctccgccg ccgccgccgc cgccgccgc tcctccggct
181 cttcgctcgg cccctctcc cctccatgtg ccggatagcg ggagcgctgc ggaccctgct
241 gccgctgctg gcggccctgc ttcaggcgctc tgtagaggct tctggtgaaa tcgcattatg

Ncad 1H7, 2B3, 1F12 - 266 -1482

301 caagactgga tttcctgaag atgtttacag tgcagtctta tcgaaggatg tgcataagg
361 acagcctctt ctcaatgtga agtttagcaa ctgcaatgga aaaagaaaaaag tacaatatga
421 gagcagtgag cctgcagatt ttaagggtga tgaagatggc atggtgtatg ccgtgagaag
481 ctttccactc tcttctgagc atgccaagtt cctgatatat gcccaagaca aagagaccga
541 gaaaagtgg caagtggcag taaaattgag cctgaagcca accttaactg aggagtcagt
601 gaaggagtca gcagaagtgg aagaaatagt gtccccaaga caattcagta agcacagtgg
661 ccacctaca aggcagaaga gagactgggt catccctcca atcaacttgc cagaaaaactc
721 caggggacct tttcctcaag agcttgctcag gatcagggtc gatagagata aaaaccttctc
781 actgcggtac agtgtaactg ggccaggggc tgaccagcct ccaactggta tcttcattat

Mutation "g" instead of "a"

841 caaccccatc tcgggtcagc tgcggtgac aaagcccctg gatcgcgagc agatagcccg
901 gtttcatttg agggcacatg cagtagatat taatggaaat caagtggaga accccattga
961 cattgtcatc aatgttattg acatgaatga caacagacct gagttcttac accagggttg
1021 gaatgggaca gttcctgagg gatcaaaaggc tggaacatat gtgatgaccg taacagcaat

14/16

Fig. 6 (Sheet 3)

1081 tgatgctgac gatcccaatg cctcaatgg gatgttgagg tacagaatcg tgtctcaggc
 1141 tccaagcacc cttcaccca acatgtttac aatcaacaat gagactggtg acatcatcac
 1201 agtggcagct ggaacttgatc gagaanaagt gcaacagtat acgttaataa ttcaagctac
 1261 agacatggaa ggcaatccca catatggcct ttcaaacaca gccacggccg tcatcacagt
 1321 gacagatgtc aatgacaatc ctccagagtt tactgcccag acgtttttatg gtgaagtctc
 1381 tgagaacagg gtagacatca tagtagctaa tctaactgtg accgataagg atcaacccca
 1441 tacaccagcc tggaacgcag gtacagaat cagtggcgga gatcctactg gacgggtcgc
 1501 catccagacc gacccaaca gcaacgacgg gttagtcacc gtggtcaaac caatcgactt
 1561 tgaacaatat aggatgtttg tccttactgt tgctgcagaa aatcaagtgc cattagccaa
 1621 ggaattcag caccgcctc agtcaactgc aaccgtgtct gttacagtta ttgacgtaaa
 1681 tgaaaaccct tatittgccc ccaatcctaa gatcattgc caagaagaag ggcttcatgc
 1741 cggtaccatg ttgacaacat tcaactgctca ggacccagat cgatatatgc agcaaatat
 1801 tagatacact aaattatctg atcctgcca atcaccaaat atagatcctg tgaatggaca
 1861 aataactaca attgctgttt tgaccgaga atcaccaaat gtgaaaaaca atatatataa
 1921 tgctactttc cttgcttctg acaatgggaat tcctcctatg agtggaaacag gaacgctgca
 1981 gatctattta cttgatatta atgacaatgc cctcaagtg ttacctcaag aggcagagac
 2041 ttgcgaaact ccagacccca attcaattaa tattacagca cttgattatg acattgatcc
 2101 aaatgctgga ccatttgctt ttgatctcca ttatctcca gtgactatta agagaaattg
 2161 gaccatcact cggcttaatg gtgattttgc tcagcttaaat ttaaagataa aatttcttga
 2221 agctgggtatc tatgaagttc ccatacataat cacagattcg ggtaatcctc ccaaatcaaa
 2281 tatttccatc ctgcgcgtga aggtttgcca gtgtgactcc aacggggact gcacagatgt

Fig. 6 (Sheet 4)

2341 ggacaggatt gtgggtgcgg ggcttggcac cggtgccatc attgccatcc tgctctgcat
2401 catcatcctg cttatccttg tgctgatgtt tgtggtatgg atgaacgcc gggataaaga
2461 acgccaggcc aaacaacttt gagggtggag gagaagaaga ccaggactat gacttgagcc agctgcagca
2521 atatgatgaa gaaggtggag gtggagcctg atgccatcaa gcctgtgga atccgacgaa tggatgaaag
2581 gcctgacact gctgagcccc gcttaaaagc gcctgacaat gacccacag ctccaccata
2641 acccatccac attaatgagg actatgaagg cagtggctcc actgctgggt ccttgagctc
2701 tggggacttc ttagtgtttg tcaagtagtg gtggtgagca gactatgat tacctgaacg actgggggcc
2761 tgactccctg tcaagtagtg aaacttgctg gacaaagtaca ttagtagtct actagcacag tgcttgcctg
2821 ccttaattcc acggttcaag ttggtttttg gctcagagg gaatatcagt gatccatact gtttggaata
2881 acggttcaag ttggtttttg gacaaagtaca ttagtagtct actagcacag gaatatcagt gatccatact
2941 ttggtttttg gacaaagtaca ttagtagtct actagcacag gaatatcagt gatccatact gtttggaata
3001 aggcctttaac ttggtttttg gacaaagtaca ttagtagtct actagcacag gaatatcagt gatccatact
3061 aaccaatttg gacaaagtaca ttagtagtct actagcacag gaatatcagt gatccatact gtttggaata
3121 cagttacact tgaattttac ggaatttagt ttctgtttta tgtggtggga gcagtaagt aaaccatgat
3181 ttttcagatt ggaatttagt ttctgtttta tgtggtggga gcagtaagt aaaccatgat atgcttcaac
3241 aagtaaaaga caaatattt tacattgcat ttgcttttat taaatacaaa aattaaacaa acaaaaaaac
3301 acgcttttgt tacattgcat ttgcttttat taaatacaaa aattaaacaa aattaaacaa acaaaaaaac
3361 tcatggagcg attttattat cttgggggat gagaccatga gattggaaaa tgtacattac
3421 ttctagtatt agactttagt ttgttttttt ttttccacta aaatcttaaa acttactcag
3481 ctggttgcaa ataaagggag ttttcataat accaatttgt agcaaaattg aattttttca
3541 taaactagaa tgtagacac attttgggtc taatccatgt acactttttt atttctgtat

77

Fig. 6 (Sheet 5)

3601 ttttccactt cactgtaaaa atagtatgtg tacataatgt tttattggca tagtctatgg
3661 agaagtgcag aaacttcaga acatgtgtat gtattatttg gactatggat tcaggttttt
3721 tgcattgtta tatctttcgt tatggataaa gtatttaca aacagtgaca tttgattcaa
3781 ttgttgagct gtagttagaa tactcaattt ttaatttttt taattttttt atttttttt
3841 ttcttttttg ttggggagg gagaaaagt cttagcaca atgttttaca taatttgtac
3901 caaaaaaaa aaaaggaaa ggaagaaaag ggtggcctg acactgggtg cactactaag
3961 tgtgtgtttt ttaaaaaaaa aaatggaaa aaaaagcct ttaaactgga gagacttctg
4021 acaacagctt tgcctctgta ttgtgtacca gaataataat gatacacctc tgaccccg
4081 gttctgaata aaatgctaata ttggaaaaa aaaaaaaa aa

Note the mutation at 808. When sequenced, it's a "g" instead of an "a" as published, codes for the same aa. The amino acids are highlighted in the attachment.

(25) Idioma de presentación: inglés

(26) Idioma de publicación: inglés

(30) Fecha de la prioridad:

12/268.302 10 de noviembre de 2008 (10.11.2008) US

(71) Solicitante (para todos los estados designados, excepto los Estados Unidos): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, California 94607-5200 (US).

(72) Inventor; y

(75) Inventor / solicitante (sólo para los Estados Unidos): REITER, Robert, E. [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Ángeles, California 90024-6017 (US).

(74) Agentes: PARENT, Annette, S. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, Eighth Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para

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

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europa (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- Publicado:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de expirar el límite de tiempo para corregir las reivindicaciones y para ser republicado en el momento de recepción de las enmiendas (Regla 48.2(h)).

(88) Fecha de la publicación del informe de búsqueda internacional: 19 de agosto de 2010

(54) Título: N-CADHERINA: BLANCO PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA DE CÁNCER

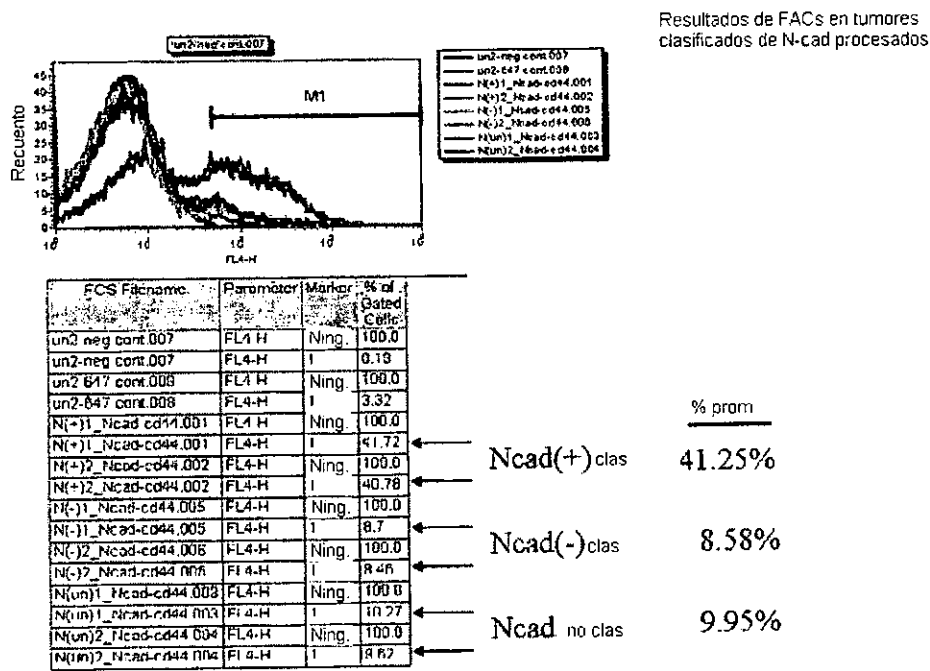


FIG. 3 (hoja 1)

(57) Resumen: LA PRESENTE INVENCION PROPORCIONA MÉTODOS DE DIAGNOSIS, PROVEYENDO UNA PROGNOSIS Y UN BLANCO TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES QUE EXPRESAN N-CADHERINA, INCLUYENDO CÁNCERES DE PRÓSTATA Y VEJIGA.

N-CADHERINA: BLANCO PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA DE CÁNCER

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad al documento USSN 12/268.302, presentado el 10 de noviembre de 2008, incorporado por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONINTRODUCCION

[0001] El cáncer de próstata es la condición maligna más común y la segunda causa de muertes relacionadas con el cáncer en los hombres en los EE.UU. El cáncer de próstata es una enfermedad biológicamente y clínicamente heterogénea. Una mayoría de hombres con esta condición maligna muestra cánceres de crecimiento lento que tal vez no incidan sobre la expectativa de vida de un individuo, mientras que otros son afectados de tumores metastásicos rápidamente progresivos. La detección selectiva por PSA tiene un valor limitado por su falta de carácter específico y su incapacidad de predecir cuáles pacientes corren el peligro de desarrollar una enfermedad metastásica refractaria de las hormonas. Los estudios recientes que preconizan reducir el umbral de PSA para el diagnóstico pueden incrementar la cantidad de diagnósticos de cáncer de próstata y complicar más aún la identificación de

pacientes con cánceres indolentes vs. cánceres agresivos (Punglia et al., *N Engl J Med*, 349: 335-342 (2003)). Se necesitan urgentemente nuevos marcadores de sueros y tejidos que se correlacionan con pronósticos clínicos o que permitan identificar pacientes con una enfermedad potencialmente agresiva (Welsh et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3410-3415 (2003)).

[0002] Los estudios de perfilado recientes sugieren que las signaturas de expresión para tumores metastásicos vs. no metastásicos puede residir en el tumor primario (Ramaswamy et al., *Nat Genet*, 33: 49-54 (2003); Sotiriou et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10393-10398 (2003)). Con alguna frecuencia, en el tumor primario puede haber presentes rasgos adicionales que predisponen a los tumores a formar metástasis en órganos específicos (Kang et al., *Cancer Cell*, 3: 537-549 (2003)). Estas observaciones recientes sugieren que es posible identificar en la etapa temprana de la enfermedad novedosos marcadores de cáncer de próstata premetastásicos o prerrefractarios a las hormonas. Estos marcadores también pueden desempeñar un rol en la biología de la progresión o evolución del cáncer de próstata metastásico o refractario a las hormonas. Los ejemplos recientes de genes presentes en tumores primarios que se correlacionan con el desenlace o diagnóstico y que desempeñan un rol en la biología de la

progresión del cáncer de próstata incluyen la EZH2 y LIM quinasa (Varambally et al., *Nature*, 419: 624-629 (2002); Yoshioka et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7247-7252 (2003)). Sin embargo, no se secreta ninguno de estos genes.

[0003] Aquí describimos un método de tratamiento o diagnóstico de un paciente con cáncer, en donde la proteína N-cadherina en las células cancerosas se expresa en niveles normales o bajos o se expresa por medio de un subgrupo de células cancerosas y no está sobreexpresada. También informamos acerca de un método de identificación de células madre de cáncer determinando la presencia o ausencia o la cantidad de proteína N-cadherina en la muestra de tejido de ensayo.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0004] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un paciente con cáncer, que comprende las etapas de: obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; determinar la presencia o ausencia o la cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; diagnosticando así dicho cáncer que expresa una proteína N-

cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos o se expresa por medio de un subgrupo de células y en donde la proteína N-cadherina no se sobreexpresa; y administrar una cantidad efectiva de anticuerpo de N-cadherina o uno de sus fragmentos al individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína de N-cadherina.

[0005] En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de células madre de cáncer, que comprende las etapas de: obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra de tejido de ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; en donde la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos o se expresa por medio de un subgrupo de células madre y no se sobreexpresa.

[0006] En una forma de realización, dicha muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga. En otra forma de realización, dicho cáncer es un cáncer de próstata. En otra forma de realización, dicho cáncer es un cáncer de vejiga. En otra forma de realización, dicho cáncer es un cáncer de próstata refractario a las hormonas. En otra forma de realización, dicho cáncer es un cáncer metastásico. En otra

forma de realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra forma de realización, el fragmento es un scFv. En otra forma de realización, el fragmento es un diacuerpo.

[0007] En cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores, el tejido, el cáncer, el sujeto o el paciente por tratar es humano o mamífero. En cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores, el cáncer puede ser un cáncer independiente de andrógenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0008] Figura 1. (a) tinción inmunohistoquímica de un cáncer de próstata LAPC 9 independiente de andrógenos, que muestra que la N-cadherina se expresa solamente por medio de un pequeño subgrupo de células (b) tratamiento de tumores LAPC-9 independientes y dependientes de andrógenos con PBS de control o anticuerpos de N-cadherina 1H7 y EC4.

[0009] Figura 2. Se clasificaron células positivas y negativas de N-cadherina, dando como resultado una población de células que eran 100% y 0% positivas para N-cadherina, respectivamente.

[0010] Figuras 3 y 4. Análisis de FACS de tumores que crecieron de células puramente positivas y negativas de N-cadherina, vs. la población de control no clasificada.

[0011] Figuras 5 y 6: secuencias de N-cadherina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] Informamos aquí acerca de la identificación, caracterización y validación de un producto génico que se expresan en cáncer de próstata y cáncer de vejiga refractarios a las hormonas. Este producto génico es N-Cadherina.

[0013] La N-cadherina no necesita ser sobreexpresada en comparación con los tejidos normales blancos de tratamiento y diagnosis. Se puede expresar en niveles bajos y también se puede expresar sólo por medio de un subgrupo de células. Los datos muestran que el direccionamiento de la N-cadherina incluso en un 5% de células de cáncer de próstata es suficiente para bloquear la progresión de cánceres de próstata a la resistencia de castración.

[0014] N-cadherina es un blanco en células madre de cáncer. Los datos que muestran que el apuntar a la N-cadherina en 5 % o menos de las células es suficiente para bloquear la progresión del tumor, es coherente con la hipótesis de que la N-cadherina es un marcador de células madre de cáncer, y que la inhibición

de la N-cadherina sobre estas células vástago es suficiente para bloquear el desarrollo o crecimiento del tumor como un todo.

[0015] Las células que expresan N-cadherina, compatible con el hecho de que se trata de un marcador de células madre de cáncer, son más tumorigénicas que las células que no expresan N-cadherina. Las células que son N-cadherina positivas pueden dar origen a células que son N-cadherina negativas, lo que también es compatible con la teoría de que la N-cadherina es un novedoso marcador de células madre de cáncer. Finalmente, los tumores deben regularse ascendentemente o adquirir N-cadherina para crecer. Es decir, las células vástago tumorales han de adquirir propiedades malignas de transición epiteliales a mesenquimales para ser tumorigénicas.

[0016] Por lo tanto, la N-cadherina es un objetivo terapéutico especialmente prometedor para la terapia contra el cáncer incluyendo, pero sin limitación, cáncer de próstata y de vejiga. Se la encuentra sobre las superficies de las células, sobreexpresada en muchos tumores epiteliales, y está asociada con la invasión, metástasis y posiblemente independencia con respecto a las hormonas andrógenas. Tal como se indica en la presente invención, las células madre de cáncer muestran una expresión normal o baja de la N-cadherina. Por ello, los anticuerpos contra la N-cadherina son un agente particularmente

preferido para su uso en el tratamiento de cánceres, los que incluyen pero no a título de limitación, los cánceres epiteliales, urogenitales (vejiga, próstata), y más particularmente, sus formas invasivas o de metástasis. En algunas formas de realización, se prefieren anticuerpos monoclonales dirigidos contra un dominio extracelular de N-cadherina. En otras formas de realización, para tratar estos cánceres se prefieren el primer dominio extracelular (EC1), porciones de los dominios primero y segundo, o el cuarto dominio extracelular. En algunas formas de realización, para estos tratamientos se prefiere particularmente el uso de un anticuerpo dirigido hacia el dominio extracelular por cuanto se ha comprobado que este dominio es importante para el potencial de pro-motilidad e invasivo (Véase, Kim et al, *J célula Biol.* 151(6):1193-206 (2000), incorporado a título de referencia en su totalidad en cuanto a la definición de los diversos dominios N-cadherina.

[0017] La expresión de N-cadherina puede contribuir a la invasión y metástasis del cáncer de próstata y vejiga, así como el progreso del cáncer de próstata en enfermedad refractaria a las hormonas. La N-cadherina puede ser un blanco terapéutico tanto sola como en combinación con otros inhibidores de moléculas pequeñas de mTOR y EGFR. El direccionamiento de la N-

cadherina puede ayudar a prevenir o controlar cáncer de próstata invasivo y metastásico.

Definiciones

[0018] "N-Cadherina" se refiere a ácidos nucleicos, por ejemplo genes, pre-mARN, mARN, y polipéptidos, variantes polimorfas, alelos, mutantes, e homólogos interespecies que: (1) tienen una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferentemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor, preferentemente sobre una región de por lo menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con respecto a un polipéptido codificado por un ácido nucleico respectivamente referenciado o de una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, por ejemplo, como se ilustra en las Figuras 5 y 6, respectivamente; (2) se ligan específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, preparados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia como se ilustra en las Figuras 5 y 6, respectivamente; fragmentos inmunógenos respectivamente de ellos; y variantes modificados de manera conservadora, de ellos; (3) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación a una secuencia de aminoácidos de referencia como se ilustra en las Figuras 5 y 6, respectivamente, y variantes

modificadas de manera conservadora, de ellos; (4) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencias de nucleótidos superior a aproximadamente 95%, preferentemente superior a aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99%, o superior, preferentemente sobre una región de por lo menos aproximadamente 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000, o más nucleótidos, con respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia mostrada, respectivamente, en las Figuras 5 y 6. Una secuencia de polinucleótido o polipéptido proviene típicamente de un mamífero que incluye, a título no limitativo, los primates, por ejemplo, un ser humano; un roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención incluyen tanto moléculas de presentación natural como recombinante.

[0019] El término "cáncer" se refiere a cánceres y carcinomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, etc., humanos; lo que incluye tumores sólidos y cánceres linfoides, cáncer de riñón, pecho, pulmón, riñón, vejiga, colon, de ovario, de próstata, páncreas, de estómago, de cerebro, cabeza y cuello, piel, de útero, testicular, de esófago e hígado, linfoma, lo que incluye linfoma de Hodgkin y linfoma que no es de Hodgkin, y mieloma múltiple. La expresión "cáncer urogenital" se refiere a los cánceres humanos del tracto

urinario y de los tejidos genitales, lo que incluye pero no a título de limitación los tejidos renales, de la vejiga, tracto urinario, uretra, próstata, pene, testículos, de vulva, vagina, cuello de útero y de ovario.

[0020] El cáncer a ser tratado en la presente puede ser uno caracterizado por una expresión baja o normal (pero no sobreexpresión) de N-cadherina. En una forma de realización de la invención, se llevará a cabo un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para determinar si el cáncer del paciente se caracteriza por la expresión baja o normal de N-cadherina. Se consideran diversos ensayos para determinar dicha expresión, y los mismos incluyen ensayos de inmunohistoquímica, FISH y antígeno de shed, southern blotting, o técnicas de PCDR. Por otra parte, la expresión o amplificación de la N-cadherina puede ser evaluada mediante un ensayo de diagnóstico in vivo, por ejemplo mediante la administración de una molécula (tal como un anticuerpo) que se liga a la molécula a ser detectada y que está rotulada con una etiqueta detectable (por ejemplo un radioisótopo radioactivo) y escaneando externamente el paciente para localizar la etiqueta. En algunas formas de realización, el cáncer o célula madre cancerosa por tratar no es todavía invasivo, pero expresa N-cadherina.

[0021] Las expresiones cánceres, células tumorales, y tumores "resistentes a la terapia" se refieren a cánceres que

se han hecho resistentes o refractarios a cualquiera o a ambos de los siguientes tipos de terapia: terapias de cáncer mediadas por apoptosis (*por ejemplo*, mediante la señalización de células receptoras muertas, *por ejemplo*, el receptor de ligando Fas, receptores TRAIL, TNF-R1, drogas quimioterapéuticas, radiación) y terapias de cáncer no mediadas por apoptosis (*por ejemplo*, fármacos tóxicos, productos químicos), lo que incluye quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia e inmunoterapia.

[0022] "Expresión baja o normal" se refiere a la expresión de ARN o proteína de N-Cadherina, en una muestra de tejido de ensayo que es aproximadamente igual o menor que la expresión de ARN o proteína de N-Cadherina en una muestra de tejido de control. En una forma de realización, la muestra de tejido es autóloga.

[0023] Las expresiones "cáncer que expresa N-cadherina" y "cáncer asociado con la expresión de N-cadherina" se refieren de manera intercambiable a células o tejidos de cáncer que expresan N-cadherina de acuerdo con la precedente definición.

[0024] Las expresiones "antígeno asociado a cáncer" o "marcador específico para tumor" se refieren de manera intercambiable a una molécula (típicamente una proteína, carbohidrato de lípido) que se expresa de manera preferente en una célula de cáncer en lugar de en una célula normal, y que es útil para el apuntamiento preferencial de un agente

farmacológico a la célula de cáncer. Es posible expresar un marcador o antígeno sobre la superficie de la célula o dentro de la célula. Frecuentemente un antígeno asociado a cáncer es una molécula que se sobreexpresa o estabiliza con una degradación mínima en una célula de cáncer en comparación con una célula normal, por ejemplo, una sobreexpresión del doble, una sobreexpresión del triple o más en comparación con una célula normal. Frecuentemente un antígeno asociado a cáncer es una molécula que está inadecuadamente sintetizada en una célula de cáncer, por ejemplo, una molécula que contiene supresiones, adiciones o mutaciones si se compara con la molécula expresada sobre una célula normal. Frecuentemente un antígeno asociado a cáncer se expresará exclusivamente en una célula de cáncer y no se sintetizará ni expresará en una célula normal. Los ejemplos de marcadores de tumores de superficie celular incluyen las proteínas c-erbB-2 y el factor del receptor del desarrollo epidérmico humano (HER, human epidermal growth factor receptor) para el cáncer de mama, PSMA para el cáncer de próstata, y los carbohidratos mucina en numerosos cánceres, lo que incluye cáncer de mama, de ovario y colorrectal. Los ejemplos de marcadores intracelulares incluyen, por ejemplo, proteínas supresoras de tumor mutadas, o proteínas de los ciclos de las células, lo que incluye p53.

[0025] La expresión "agonista" se refiere a un agente que se liga a un polipéptido o polinucleótido de la invención, estimula, incrementa, activa, facilita, refuerza la activación, sensibiliza o regula ascendentemente la actividad o expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención.

[0026] La expresión "un antagonista" se refiere a un agente que inhibe la expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención o que se liga a, bloquea total o parcialmente la estimulación, disminuye, impide, retarda la activación, desactiva, desensibiliza, o regula descendentemente la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención.

[0027] Las expresiones "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión o de la actividad se utilizan para referirse a moléculas inhibidoras, activadoras, o moduladoras, que se identifican mediante ensayos in vitro e in vivo para establecer la expresión o actividad, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión de un polipéptido o de un polinucleótido de la invención o que se ligan a, bloquean parcialmente o totalmente la estimulación de bloque o la actividad enzimática, o que se ligan o bloquean parcialmente o totalmente la estimulación de bloque o la actividad enzimática, disminuyen, previenen, retardan la

activación, desactivan, desensibilizan o regulan descendientemente 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 que se ligan, estimulan, incrementan, abren, activan, facilitan, refuerzan la activación o la actividad enzimática, sensibilizan o regulan ascendentemente la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas y similares, de presentación natural o sintéticos. Los ensayos para identificar inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, la aplicación de potenciales compuestos moduladores a células, en la presencia de o ausencia de un polipéptido o polinucleótido de la invención y seguidamente se determinan los efectos funcionales sobre la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención. Las muestras o ensayos que comprenden un polipéptido o polinucleótido de la invención que son tratados con un activador, inhibidor, o modulador, potenciales, se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador, o modulador para observar la amplitud del efecto. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad relativa del 100%. Se lleva a cabo la inhibición

cuando el valor de la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención con respecto al control es de aproximadamente el 80%, opcionalmente 50% o 25-1%. Se logra la activación cuando el valor de la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención con respecto al control es del 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1.000-3.000% superior.

[0028] Las expresiones "compuestos de prueba" o "candidato a fármaco" o "modulador" o sus equivalentes gramaticales, tal como se utilizan en la presente describen cualquier molécula, de presentación natural o sintética, por ejemplo, proteína, oligopéptido (por ejemplo, con una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos, preferentemente con una longitud de aproximadamente 10 a 20 o de 12 a 18 aminoácidos, preferentemente con una longitud de 12, 15, o 18 aminoácidos), pequeñas moléculas orgánicas, polisacáridos, lípidos, ácidos grasos, polinucleótidos, ARNi, siARN, anticuerpo, oligonucleótido, etc. Los compuestos de prueba pueden estar en forma de una biblioteca de compuestos de prueba, tal como una biblioteca combinatoria o aleatorizada que provea un suficiente intervalo de diversidad. Los compuestos de prueba están opcionalmente ligados a un compañero de fusión, por ejemplo, compuestos de apuntamiento, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizadores, compuestos

dirigibles, y otras partes funcionales. De manera convencional, las nuevas entidades químicas con propiedades útiles se generan mediante la identificación de un compuesto de prueba (denominado "compuesto de guía") con alguna propiedad o actividad deseables, por ejemplo, una actividad inhibidora, creándose variantes del compuesto de guía, y evaluándose la propiedad o actividad de dichos compuestos variantes. Es frecuente que para un análisis de este tipo se utilicen métodos HTS (high throughput screening, detección selectiva de elevado paso).

[0029] La expresión "pequeña molécula orgánica" se refiere a una molécula orgánica, de presentación natural o sintética, que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 50 Daltons y de menos de aproximadamente 2.500 Daltons, preferentemente, inferior a aproximadamente 2.000, preferentemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000 Daltons, más preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 500 Daltons.

[0030] Los agentes citotóxicos incluyen fármacos "específicos para el ciclo de las células" o "antimitóticos" o de "interacción citoesquelética". Estos términos se refieren de manera intercambiable a cualquier agente farmacológico que bloquee las células en mitosis. Tales agentes son útiles en quimioterapia. En términos generales, los fármacos específicos

para el ciclo de las células se ligan a la proteína tubulina citoesquelética y bloquean la capacidad de la tubulina de polimerizarse en forma de microtúbulos, con el resultado de la detención de la división de las células en metafase. Los ejemplos de fármacos relacionados con el ciclo de las células incluyen los alcaloides vinca, taxanos, colchicina, y podofilotoxina. Los ejemplos de vinca alcaloides incluyen la vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. Los ejemplos de taxanos incluyen paclitaxel y docetaxel. Otro ejemplo de fármaco de interacción citoesquelética es 2-metoxiestradiol.

[0031] Las expresiones "siARN" o "ARNi" se refieren a un ácido nucleico que forma un ARN de doble filamento, cuyo ARN de doble filamento tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen apuntado cuando el siARN expresado en la misma célula como el gen o gen apuntado. Por lo tanto, las expresiones "siARN" o "ARNi" se refieren al ARN de doble filamento formado por los filamentos complementarios. Las porciones complementarias del siARN que se hibridan de manera de formar la molécula de doble filamento tienen una identidad sustancial o completa. En una forma de realización, un siARN se refiere a un ácido nucleico que tiene una identidad sustancial o completa con un gen apuntado y forma un siARN de doble filamento. Típicamente, el siARN tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 15-50 nucleótidos (por ejemplo, cada

secuencia complementaria del siARN de doble filamento tiene una longitud de aproximadamente 15-50 nucleótidos, y la longitud del siRNA de doble filamento es de aproximadamente 15-50 pares de base, preferentemente de aproximadamente 20-30 nucleótidos de base, preferentemente aproximadamente 20-25 o de aproximadamente 24-29 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos de longitud.

[0032] El diseño y la preparación de moléculas y vectores de siARN son bien conocidos de la persona con pericia en la especialidad. Por ejemplo, un proceso eficiente para diseñar un siARN adecuado consiste en empezar en el codón de inicio AUG del transcripto de mRNA y escanear en busca de secuencias de dinucleótidos de AA (Véase, Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888 (2001). Cada AA y los nucleótidos 3' adyacentes son sitios potenciales de objetivos siARN. La longitud de la secuencia de sitio adyacente determinará la longitud del siARN. Por ejemplo, 19 sitios adyacentes darían un siARN de 21 nucleótidos de longitud. Los siARNs con 3' que sobrevuela dinucleótidos UU son frecuentemente los más efectivos. Este enfoque es también compatible con el uso de ARN pol III para transcribir siARNs de hebilla. El ARN pol III termina la transcripción en los tractos poli(T) de 4 nucleótidos de manera de crear moléculas de ARN que tienen un corta cola poli(U). Sin embargo, los siARNs con

otros sobrevuelos de dinucleótidos 3' terminales también pueden inducir de manera efectiva los ARNi, y es posible seleccionar la secuencia empíricamente. Para la selectividad, es posible evitar secuencias objetivo con más de 16 - 17 pares de bases contiguas de homología con respecto a otras secuencias codificadoras, para lo cual se lleva a cabo una búsqueda con BLAST (Véase, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

[0033] El siARN puede administrarse directamente, o es posible utilizar vectores de expresión siARN para inducir con dichos criterios de diseño. Un vector puede tener dos repeticiones invertidos separados por una corta secuencia separadora que terminan con un filamento de T que sirven para terminar la transcripción. Se predice que el transcripto de ARN expresado se plegará en un siARN de hebilla corta. La selección de la secuencia objetivo de siARN, la longitud de las repeticiones invertidas que codifican el vástago de una hebilla potencial, el orden de las repeticiones invertidas, la longitud y composición de la secuencia separadora que codifica el bucle de la hebilla, y la presencia o ausencia de los sobrevuelos 5', pueden variar. Un orden preferido para el casete de expresión de siARN es: filamento de sentido, separador corto, y filamento antisentido. Los siARNs de hebilla con varias longitudes de vástago (por ejemplo, de 15 a 30) pueden ser adecuados. La longitud de los filamentos de sentido y antisentido que ligan

los bucles del siARN de hebilla pueden tener variadas longitudes (por ejemplo, de 3 a 9 nucleótidos, o más largos). Los vectores pueden contener promotores y reforzadores de expresión u otros elementos reguladores que están operablemente ligados a la secuencia de nucleótidos que codifican el siARN. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ARN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora operablemente ligada en un organismo hospedante particular. Las secuencias de control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de ligación ribosoma. Es sabido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y reforzadores. Estos elementos de control pueden estar diseñados para permitir que el médico clínico active o desactive la expresión del gen mediante la adición o control de factores externos a los cuales responden los elementos reguladores.

[0034] Para la construcción de vectores adecuados que contienen el agente terapéutico deseado y las secuencias de control se emplean técnicas de ligación de restricción estándar bien conocidos de la persona con pericia en la especialidad (Véase Maniatis et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)). Los plásmidos, secuencias de DNA, o oligonucleótidos sintetizados,

aislados, son desdoblados, ajustados a medida, y vueltos a enlazar en la forma deseada.

[0035] El ácido nucleico está "operablemente ligado" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o líder secretorio está operablemente ligado a DNA para un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido: un promotor o reforzador está operablemente ligado a una secuencia de codificación si influye sobre la transcripción de la secuencia; o un sitio de ligación ribosoma está operablemente ligado a una secuencia de codificación si está posicionado de manera de facilitar la traducción. En términos generales, "operablemente ligado" significa que las secuencias de ADN que se están ligando están cercanas entre sí, y, en el caso de un líder secretorio, contiguos y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los reforzadores sean contiguos entre sí. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción adecuados. Si tales sitios no existen, se utilizan los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos, de acuerdo con la práctica convencional.

[0036] La expresión "determinación del efecto funcional" se refiere al hecho de someter a ensayo un compuesto que incrementa o disminuye un parámetro que se halla indirecta o

directamente bajo la influencia de un polinucleótido de la invención, por ejemplo, la medición de efectos físicos y químicos o fenotípicos. Tales efectos funcionales pueden medirse mediante cualquier medio conocido de la persona con pericia en la especialidad, por ejemplo, mediante cambios en las propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorción, índice de refracción), hidrodinámicos (por ejemplo, la forma), cromatográficas o de solubilidad de la proteína; la medición de marcadores inducibles o la activación transcripcional de la proteína; la medición de la actividad de ligación o de los ensayos de ligación, por ejemplo la ligación a los anticuerpos; la medición de cambios en la afinidad de la ligación del ligando; la medición del flujo de calcio ingresante; la medición de la acumulación de un producto enzimática de un polipéptido de la invención o el agotamiento de un sustrato; cambios en la actividad enzimática, por ejemplo, la actividad de quinasas, la medición de cambios en los niveles de las proteínas de un polipéptido de la invención; la medición de una estabilidad de ARN; la ligación de la proteína G; la fosforilación o desfosforilación de GPCR; la transducción de señales, por ejemplo, las interacciones entre receptor y ligando; las concentraciones del segundo mensajero (por ejemplo, cAMP, IP3, o Ca^{2+} intracelular); la identificación de la expresión de genes corriente abajo o de genes informantes

(CAT, luciferasa, β -gal, GFP y similares), por ejemplo, mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, ligación de anticuerpos, marcadores inducibles, y ensayos de ligación de ligandos.

[0037] Las muestras o ensayos que comprenden un ácido nucleico o proteína revelados en la presente que son tratados con un activador, inhibidor, o modulador potenciales, son comparados con muestras de control sin el inhibidor, activador, o modulador a efectos de examinar la amplitud de la inhibición. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor de actividad relativa de proteína del 100%. La inhibición ha sido realizada cuando el valor relativo de la actividad con respecto al control es de aproximadamente 80%, preferentemente 50%, más preferentemente 25-0%. La activación se ha logrado cuando el valor relativo de la actividad con respecto al control (que no ha sido tratado con activadores) es de 110%, más preferentemente 150%, más preferentemente 200-500% (por ejemplo, con un valor que es del doble o quíntuplo del valor del control), más preferentemente superior en 1.000-3.000%.

[0038] La expresión "muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, y secciones congeladas tomadas para estudios histológicos. Tales muestras incluyen sangre y fracciones o productos de sangre (por

ejemplo, suero, plasma, plaquetas, células rojas de la sangre, y similares), esputos, tejidos, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes, y células transformadas, heces, orina, etc. Típicamente se obtiene una muestra biológica a partir de un microorganismo eucariota, más preferentemente un mamífero tal como un primate por ejemplo, chimpancé o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobayo, rata, ratón, conejo; o un ave, reptil o pez.

[0039] El término "biopsia" se refiere al proceso de remover un tejido para su evaluación para diagnóstico o pronóstico; y al espécimen de tejido como tal. En los métodos de diagnóstico y de pronóstico de la presente invención puede emplearse cualquier técnica de biopsia. La técnica de biopsia utilizada dependerá del tipo de tejido a ser evaluado (es decir, próstata, nódulo linfático, hígado, célula sanguínea), el tamaño y tipo del tumor (es decir, tumor sólido o en suspensión (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Las técnicas representativas de biopsia abarcan biopsia de escisión, biopsia de aguja, biopsia quirúrgica, y biopsia de médula ósea. Una "biopsia de escisión" se refiere a la remoción de una masa tumoral entera con un pequeño margen de tejido normal que lo rodea. Una "biopsia de incisión" se refiere a la remoción de una cuña de tejido que incluye un diámetro en sección transversal del tumor. Se si efectúa un diagnóstico o

pronóstico mediante endoscopia o fluoroscopia puede requerirse una "biopsia de núcleo-aguja" de la masa tumoral, o una "biopsia de aspiración por aguja fina" que en términos generales permite obtener una suspensión de células de dentro de la masa tumoral. Las técnicas de biopsia se exponen por ejemplo en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper, et al., eds., 16th ed., 2005, Chapter 70, y a lo largo de la Parte V.

[0040] Las expresiones "idéntico" o "identidad porcentual" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de radicales aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, con una identidad de aproximadamente el 60%, preferentemente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una identidad superior sobre una región determinada, en comparación y alineado de manera de obtener una máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designadas, medida mediante algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos en lo que sigue o mediante alineación manual e inspección visual (Véase, por ejemplo, NCBI web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). En este caso se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas".

Esta definición también se refiere a, o puede aplicarse a, al complemento de una secuencia de prueba. La definición también incluye secuencias que tienen supresiones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe en lo que sigue, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta los huecos y similares. Es preferible que la identidad exista sobre una región que tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferentemente sobre una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos.

[0041] Para la comparación de las secuencias, típicamente una de las secuencias actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utilice un algoritmo para la comparación de secuencias, se ingresan las secuencias de prueba y de referencia en un computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, en caso de ser necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo para las secuencias. Es preferible que puedan utilizarse parámetros de programa por defecto, o que pueden designarse parámetros alternativos. Seguidamente el algoritmo de comparación calcula las identidades porcentuales de las secuencias para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, sobre la base de los parámetros del programa.

[0042] La expresión "ventana de comparación", tal como se la utiliza en la presente, incluye referencias a un segmento de una cualquiera de entre la pluralidad de posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo consistente en de 20 a 600, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la cual es posible comparar una secuencia con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas después de haberse alineado de manera óptima las dos secuencias. Los métodos para la alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos de la persona con pericia en la especialidad. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de la búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 suplemento)).

[0043] Ejemplos preferidos de algoritmo que son adecuados para determinar la identidad porcentual de las secuencias y la similitud entre las secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, descritos en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El BLAST y el BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros descritos en la presente, para determinar la identidad porcentual de las secuencias y para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para llevar a cabo los análisis por BLAST está disponible públicamente por intermedio del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica empezar por identificar HSPs (high scoring sequence pairs, pares de secuencias de elevado puntaje) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que sea concuerden con satisfagan algún puntaje T de umbral de valor positivo cuando están alineadas con una palabra de la misma longitud en la secuencia de base de datos. Por definición T es el umbral de puntaje de palabras de vecindad (Altschul *et al.*, *supra*). Estas coincidencias de palabras de vecindad inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas destinadas a encontrar HSPs más largos que los contengan. Las concordancias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mientras sea posible incrementar el

puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan mediante la utilización, para las secuencias de nucleótidos, de los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos concordantes; siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos no concordantes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: decae el puntaje de alineación acumulativo por la cantidad X a partir de su máximo valor logrado; el puntaje acumulativo pasa a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se ha llegado al extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como defectos una longitud de palabra (W) igual a 11, una expectativa (E) igual a 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambos filamentos. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como defectos una longitud de palabra igual a 3, y una expectativa (E) igual a 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) iguales a 50, expectativa (E) igual a 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambos filamentos.

[0044] La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de ellos en forma de un solo filamento o de dos filamentos, y a complementos de ellos. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos o enlaces de nucleótidos, o residuos medulares análogos o modificados que son sintéticos, de presentación natural, y de presentación no natural, que tienen propiedades de ligación similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a la de los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, quirál-metil fosfonatos, 2-O-metil ribonucleótidos, péptido-ácidos nucleicos (PNAs)).

[0045] A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico en particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservadora, de ellos (por ejemplo, sustituciones degeneradas de codones) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, es posible lograr sustituciones degeneradas de codones mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o la totalidad de ellos) está sustituida por radicales de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner et al., *Ácido nucleico Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985);

Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se utiliza de manera intercambiable con gen, cADN, mRNA, oligonucleótido y polinucleótido.

[0046] Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente "variantes de empalme". De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de empalme de dicho ácido nucleico. Las "variantes de empalme", como sugiere el nombre, son productos de empalme alternativo de un gen. Después de la transcripción, es posible desempalmar un transcripto de ácido nucleico inicial de manera tal que diferentes (alternados) productos de empalme de ácido nucleico codifiquen diferentes polipéptidos. Los mecanismos para la producción de las variantes de empalme varían, pero incluyen el empalmado alternado de exones. La presente definición también abarca polipéptidos alternados derivados del mismo ácido nucleico mediante transcripción de lectura pasante. En esta definición también se incluyen productos de una reacción de empalme, lo que incluye formas recombinantes de los productos de empalme. Un ejemplo de variantes de empalme de canales de potasio se expone en Leicher, et al., *J. Biol. Chem.* 273(52):35095-35101 (1998).

[0047] En la presente, las expresiones "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable

para referirse a un polímero de radicales aminoácidos. Las expresiones rigen para polímeros de aminoácidos en los que uno o más radicales aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido de presentación natural, así como para polímeros de aminoácidos que se presentan en la naturaleza y polímeros de aminoácidos de presentación natural.

[0048] La expresión "aminoácido" se refiere a aminoácidos de presentación natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a las de los aminoácidos que se presentan naturalmente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente son aquellos codificados por el código genético, tales como aquellos aminoácidos que se modifican ulteriormente, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. La expresión "análogos de aminoácidos" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de presentación natural, es decir, un carbono α que está ligado a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o médulas de péptido modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de presentación natural. La expresión "miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que

tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a la de un aminoácido de presentación natural.

[0049] En la presente, los aminoácidos pueden designarse sea mediante sus símbolos de tres letras, comúnmente conocidos, o mediante los símbolos de una sola letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. De manera similar, los nucleótidos pueden designarse mediante sus códigos comúnmente aceptados de una sola letra.

[0050] La expresión "variantes modificadas de manera conservadora" rige tanto para secuencias de aminoácidos como para secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, la expresión "variantes modificadas de manera conservadora" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde una alanina está especificada por un codón, es posible alterar el codón en forma de cualquiera de los codones correspondientes

descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifique un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Una persona con pericia en la especialidad reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede ser modificado de manera de obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifique un polipéptido se halla implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales.

[0051] En cuanto a las secuencias de aminoácidos, una persona con pericia en la especialidad reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones, individuales, a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que altere, añada o suprima un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservadora" en la que la alteración tiene como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica son bien

conocidas tablas de sustitución conservadoras que proveen aminoácidos funcionalmente similares. Además, tales variantes modificadas de manera conservadora no excluyen variantes polimorfas, homólogos interespecie, y alelos de la invención.

[0052] Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos 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), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

[0053] Una "etiqueta" o "parte detectable" es una composición que es detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, u otros medios físicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen ^{32}P , tintes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se utilizan comúnmente en ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de una radioetiqueta en el péptido utilizado para detectar los anticuerpos que de manera específica reaccionan con el péptido.

[0054] La expresión "recombinante" cuando se la utiliza, por ejemplo con referencia a una célula, o anticuerpo, proteína, o

vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o mediante la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula ha sido derivada de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se hallan dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresan genes nativos que por lo demás se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

[0055] La expresión "heterólogo/a" cuando se la 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, típicamente el ácido nucleico se produce de manera recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos de manera de obtener un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor tomado de una fuente y una región de codificación tomada de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se hallan en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

[0056] La expresión "condiciones de hibridación estrictas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará

con su subsecuencia apuntada, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Puede encontrarse una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos 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 términos generales, se seleccionan las condiciones estrictas de manera que sean de aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica bajo una intensidad iónica definida pH. El T_m es la temperatura (bajo una intensidad iónica definida, pH, y bajo una concentración nucleica definida) bajo la cual el 50% de las sondas complementarias con respecto al objetivo se hibridan con la secuencia objetivo en equilibrio (dado que las secuencias objetivo se hallan presentes en exceso, a T_m , 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones estrictas también pueden lograrse mediante la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es de por lo menos dos veces el segundo plano, preferentemente una hibridación de 10 veces el segundo plano. Ejemplos de

condiciones de hibridación estrictas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42°C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2 x SSC, y SDS al 0,1 % a 65°C.

[0057] Los ácidos nucleicos que no se hibridan bajo condiciones estrictas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando el codón de degeneración máxima permitido por el código genético. En tales casos, típicamente los ácidos nucleicos hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente estrictas. Las "condiciones de hibridación moderadamente estrictas" incluyen una hibridación en una solución tampón de 40% de formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es de por lo menos el doble del segundo plano. Una persona con pericia en la especialidad reconocerá fácilmente que es posible utilizar condiciones de hibridación y de lavado alternativas a efectos de proveer condiciones iguales de estrictas. Se proveen directivas adicionales para determinar parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, et al., John Wiley & Sons.

[0058] Para el PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para una amplificación poco estricta, si bien las temperaturas para el tratamiento térmico pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C en función de la longitud del cebador. Para la amplificación por PCR muy estricta, una temperatura de aproximadamente 62°C es típica, si bien las temperaturas de tratamiento térmico muy estrictas pueden variar entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C, en función de la longitud del cebador y de su carácter específico. Las condiciones de ciclo típicas tanto para las ampliaciones muy estrictas como poco estrictas incluyen una fase de desnaturalización de 90°C - 95°C durante 30 sec - 2 min., una fase de tratamiento térmico que dura 30 sec. - 2 min., y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1 - 2 min. Se proveen protocolos y directivas para la amplificación poco y muy estricta en por ejemplo Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.).

[0059] El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de armazón tomada de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que de manera específica se ligan a, y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región

constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon, y mu, así como la miríada de las regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas livianas se clasifican sea como kappa sea como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o ypsilon, los que su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de ligación de antígeno de un anticuerpo será el más crítico en cuanto al carácter específico y de afinidad de la ligación.

[0060] Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "liviana" (de aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). El terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos primariamente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones "cadena variable liviana" (V_L) y "cadena pesada variable" (V_H) se refieren a estas cadenas livianas y pesadas, respectivamente.

[0061] Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como una cantidad de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un

anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra de manera de producir el $F(ab)'_2$, que es un dímero de Fab que de por sí es una cadena liviana unida a V_H-C_H1 mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse bajo condiciones moderadas para descomponer el enlace disulfuro en la región de bisagra, con lo que se convierte el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra (Véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed. 1993). Si bien se definen varios fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona con pericia en la especialidad comprenderá que tales fragmentos pueden sintetizarse de novo sea químicamente sea mediante la utilización de tecnología de ADN recombinante. Por lo tanto, la expresión "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpo sea producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros, sea aquellos sintetizados de novo mediante tecnologías de DNA recombinantes (por ejemplo, Fv de cadena simple) o aquellos identificados mediante bibliotecas de visualización de fagos (Véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)).

[0062] Para la preparación de anticuerpos adecuados de la invención y para su uso de acuerdo con la invención, es posible utilizar muchas técnicas recombinantes, monoclonales, o

policlonales conocidas de la persona con pericia en la especialidad (Véanse, 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 y Cáncer Terapia*, 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 livianas y pesadas de un anticuerpo de interés pueden clonarse a partir de una célula, por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden ser clonados a partir de un hibridoma y utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas de gen que codifican cadenas livianas y pesadas de anticuerpos monoclonales también pueden hacerse a partir de células de hibridoma o de plasma. Las combinaciones aleatorias de los productos de genes de las cadenas livianas y pesadas generan un gran conjunto de anticuerpos con diferentes caracteres antigénicos (Véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology* (3rd ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple o de anticuerpos recombinantes (Patente de los EE.UU. N° 4.946.778, Patente de los EE.UU. N° 4.816.567) pueden adaptarse para producir anticuerpos mediante polipéptidos de esta invención. Asimismo, es posible utilizar ratones transgénicos y otros organismos

tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanos (Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nros. 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)). Como alternativa, es posible utilizar la tecnología de visualización de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos de Fab heteroméricos que de manera específica se ligan a antígenos seleccionados (Véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). También es posible hacer que los anticuerpos sean biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (Véase, por ejemplo, WO 93/08829, Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos de manera covalente, o inmunotoxinas (Véanse, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.676.980, WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

[0063] Los métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son bien conocidos de la persona con pericia en la

especialidad. En términos generales, un anticuerpo humanizado tiene uno o más radicales aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos radicales aminoácidos no humanos reciben frecuentemente la denominación de radicales importados, que típicamente están tomados de un dominio variable de importación. La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (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)), mediante la sustitución de secuencias CDRs o CRD de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por lo tanto, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido reemplazado por la correspondiente secuencia tomada de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanizados en los que algunos radicales CDR y eventualmente algunos radicales FR han sido reemplazados por radicales tomados de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

[0064] Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que: (a) la región constante, o una porción de

la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada de manera tal que el sitio de ligación del antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase diferente o alterada, función y/o especie efectoras, o a una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de desarrollo, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene un carácter específico distinto con respecto al antígeno diferente o alterado. Los anticuerpos preferidos de, y para uso de acuerdo con la invención, incluyen anticuerpos monoclonales humanizados y/o quiméricos.

[0065] En una forma de realización, el anticuerpo está conjugado a una parte "efectora". La parte efectora puede ser cualquier cantidad de moléculas, lo que incluye partes etiquetantes tales como etiquetas radioactivas o etiquetas fluorescentes, o puede ser una parte terapéutica. En un aspecto el anticuerpo modula la actividad de la proteína. Dichas partes efectoras incluyen, pero no se limitan a, un fármaco anti-tumor, una toxina, un agente radioactivo, una citoquina, un segundo anticuerpo o una enzima. Por otra parte, la invención provee una forma de realización en la que el anticuerpo de la

invención está ligado a una enzima que convierte un profármaco en un agente citotóxico.

[0066] El inmunoconjugado puede ser utilizado para apuntar la parte efectora hacia una célula positiva frente a la N-cadherina, particularmente células que expresan la proteína N-cadherina. Dichas diferencias pueden ser fácilmente evidentes cuando se examinen las bandas de geles con cargas aproximadamente iguales de muestras de prueba y de control. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, ricina, doxorrubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, y glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelador de metales o una enzima.

[0067] En algunas formas de realización, la invención provee anticuerpos a la N-cadherina. Los anticuerpos de N-cadherina pueden ser utilizados sistémicamente para tratar el cáncer (por ejemplo, el cáncer de próstata o el cáncer de vejiga) solo o cuando están conjugados con una parte efectora. Los anticuerpos de N-cadherina conjugados con agentes tóxicos, tales como

ricina, así como también los anticuerpos no conjugados pueden ser agentes terapéuticos útiles naturalmente apuntados a células de cáncer de próstata portadoras de N-cadherina. Tales anticuerpos pueden ser útiles para bloquear el grado de invasión. Los anticuerpos de N-cadherina para uso de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, EC4, 1H7, 1F12, 2B3, así como los anticuerpos descritos en los documentos USSN 61/113.042 y 61/113.054, incorporados en la presente por referencia en su totalidad.

[0068] Adicionalmente, la proteína recombinante de la invención que comprende la región antígeno-ligación de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención pueden utilizarse para tratar cáncer. En una situación como ésta, la región antígeno-ligación de la proteína recombinante se une a por lo menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tiene una actividad terapéutica. La segunda proteína puede incluir, pero no se limita a, una enzima, linfoquina, oncostatina o toxina. Las toxinas adecuadas incluyen doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, ricina, abrina, glucocorticoides y radioisótopos.

[0069] Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas (Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs En 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 En Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal 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)).

[0070] La expresión "se liga de manera específica (o de manera selectiva)" a un anticuerpo o "es inmunorreactivo de manera específica (o de manera selectiva) con", cuando se refiera a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de ligación que es determinante de la presencia de la proteína, frecuentemente en una población heterogénea de proteínas y otros materiales biológicos. Por lo tanto, bajo condiciones de inmunoensayo designados, los anticuerpos especificados se ligan a una proteína particular por lo menos en un magnitud que es de por lo menos dos veces la del segundo plano y más típicamente más de 10 a 100 veces que el segundo plano. La ligación

específica bajo tales condiciones requiere un anticuerpo que haya sido seleccionado en base a su carácter específico frente a una proteína en particular. Por ejemplo, es posible seleccionar anticuerpos policlonales de manera de obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que de manera específica sean inmunorreactivos con el antígeno seleccionado y no contra proteínas. Esta selección puede efectuarse eliminando por resta los anticuerpos que reaccionen cruzadamente con otras moléculas. Puede utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína en particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA de fase sólida para seleccionar anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con una proteína (Véase, *por ejemplo*, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica.

[0071] La expresión "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere en la presente a una dosis que produce los efectos para los cuales se la administra. La dosis y la formulación exactas dependerán de la finalidad del tratamiento, y podrán ser determinadas por una persona con pericia en la especialidad que utilice las técnicas conocidas (Véase, *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 Edition, Gennaro, Editor (2003), y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

[0072] La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" tiene por finalidad referirse a la inclusión de sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, en función de los sustituyentes particulares hallados en los compuestos descritos en la presente. Si los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, las sales por adición de ácidos pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, sea pura sea en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales por adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de amonio, sales amino orgánicos, o sales de magnesio, o sales similares. Si los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, es posible obtener sales por adición de ácidos mediante la puesta en contacto de la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, sea en forma pura sea en un solvente inerte adecuado. Los

ejemplos de sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen los derivados de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido monohidrógeno-carbónico, ácido fosfórico, ácido monohidrógeno-fosfórico, ácido dihidrógeno-fosfórico, ácido sulfúrico, ácido monohidrógeno-sulfúrico, ácido yodhídrico o ácido fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido maleico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido subérico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido ftálico, ácido bencensulfónico, ácido p-tolilsulfónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, y similares. También se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como ácido glucurónico o ácido galacturónico y similares (Véase, por ejemplo, Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen ambas funcionalidades, la básica y la ácida, que permiten que los compuestos sean convertidos en bases de adición de base o de ácido. Para la presente invención son también adecuados otros vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos de la persona con pericia en la especialidad.

[0073] Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto progenitor de la manera convencional. La forma progenitora del compuesto difiere de las diversas formas de sales en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en solventes polares, pero por lo demás para los fines de la presente invención las sales son equivalentes a la forma progenitora del compuesto.

[0074] Además de las formas de sal, la presente invención provee compuestos que se hallan en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en la presente son aquellos compuestos que fácilmente experimentan cambios químicos bajo condiciones fisiológicas de manera de proveer los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, es posible convertir los profármacos en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos o bioquímicas en un entorno ex vivo. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se los coloca en un reservorio parche transdérmico junto con un enzima o reactivo químico adecuados.

[0075] Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvato así como en formas solvato, lo que incluye las formas hidratadas. En términos generales, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no

solvatadas y están destinadas a quedar incluidas dentro de los alcances de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En términos generales, todas las formas físicas son equivalentes para los usos considerados por la presente invención, y están destinadas a quedar incluidas dentro de los alcances de la presente invención.

[0076] Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos y los isómeros individuales, están destinados a quedar incluidos, todos ellos, dentro de los alcances de la presente invención.

[0077] La expresión EMT (Mesenchymal Transición, Transición Mesenquimal) se refiere a la adquisición de rasgos estromales por células de tumor epitelial. En el cáncer, el EMT está asociado con un comportamiento invasivo y motil y puede ser un proceso central subyacente a la metástasis. El EMT está asociado con un pobre pronóstico y es mediado por múltiples factores de transcripción, tales como, SNAIL, SLUG y TWIST.

Formas de realización detalladas

[0078] La presente invención proporciona métodos de diagnóstico y provee una prognosis para individuos en riesgo de un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcritos de mRNA, en particular cánceres urogenitales que incluyen cáncer de próstata y/o vejiga. Los métodos comprenden en general poner en contacto una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcritos de mRNA con un anticuerpo que específicamente se une a una proteína N-Cadherina; y determinar la presencia o ausencia de una proteína N-Cadherina en la muestra de tejido de ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo conocido por ser negativo para un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcritos de mRNA. Típicamente, la muestra de tejido es suero, pero también puede tratarse de un tejido tomado de una biopsia, particularmente de un tejido urogenital, lo que incluye tejido de próstata o tejido de vejiga. Usualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Se indica un diagnóstico positivo para un cáncer que expresa una proteína N-cadherina o un transcritos de mRNA si se detecta un nivel superior de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que no tiene cáncer, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, el doble, el triple, el cuádruple, más

elevado, o más. Los métodos de detección pueden llevarse a cabo por ejemplo mediante técnicas ELISA estándar conocidas de la persona con pericia en la especialidad (*reviewed in* Gosling, *Immunoassays: A Practical Approach*, 2000, Oxford University Press). La detección se lleva a cabo etiquetando un anticuerpo primario o un anticuerpo secundario con, por ejemplo, un isótopo radioactivo, una etiqueta fluorescente, una enzima o cualquier otra etiqueta detectable conocida de la persona con pericia en la especialidad.

[0079] En otra forma de realización, la invención proporciona métodos de diagnosis y provee una prognosis para individuos en riesgo de un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcripto de mRNA, en particular un cáncer de próstata o vejiga, al poner en contacto una muestra de tejido de ensayo de un individuo con riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcripto de mRNA con un primer grupo de un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido que hibridan específicamente cada uno en un ácido nucleico de N-Cadherina; amplificando el ácido nucleico de N-cadherina en la muestra; y determinando la presencia o ausencia del ácido nucleico de N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo para un cáncer que expresa una proteína N-cadherina o un

transcripto de mRNA. Nuevamente, usualmente la muestra de tejido es suero, pero también podría ser un tejido tomado de una biopsia, particularmente un tejido urogenital, lo que incluye un tejido de próstata o vejiga. Se indica un diagnóstico positivo para un cáncer que expresa una proteína N-cadherina o un transcripto de mRNA si en una muestra de tejido de prueba se detecta un nivel más elevado de ARN transcripto de N-cadherina en comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que no tiene cáncer.

[0080] La invención también proporciona métodos para mejorar la respuesta a la terapia contra el cáncer en un cáncer que expresa una proteína N-Cadherina o transcripto de mRNA por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la unión de la proteína N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-Cadherina en una célula del tejido tumoral de cáncer. En algunas formas de realización, los métodos de inhibición de la unión de N-Cadherina con su receptor se llevan a cabo concurrentemente con otra terapia anticáncer, incluyendo, por ejemplo, conocidos agentes quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos y radioterapia para revertir la resistencia, la progresión del tumor y metástasis.

[0081] La presente invención también proporciona métodos de inhibición del crecimiento y promoción de la regresión de un tumor que expresa la proteína N-Cadherina, métodos que

comprenden la inhibición de la unión de la proteína N-Cadherina, respectivamente, con el receptor de N-Cadherina en una célula del tejido tumoral. Los métodos se pueden llevar a cabo por administración a un individuo que necesita una cantidad suficiente de un compuesto que inhibe la unión de una proteína N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-Cadherina. En algunas formas de realización, el compuesto se une específicamente con una proteína N-Cadherina. En algunas formas de realización, el compuesto se une específicamente con un receptor de N-Cadherina. En algunas formas de realización, el compuesto evita la transcripción o la traducción de una proteína N-Cadherina. Los métodos se usan en particular en el tratamiento de cáncer de próstata y vejiga. En algunas formas de realización, el compuesto comprende un polipéptido, incluyendo un anticuerpo o uno de sus análogos o fragmentos de un polipéptido de N-Cadherina.

[0082] Los métodos encuentran una aplicación particular en la diagnosis, prognosis y el tratamiento de los cánceres de próstata y de vejiga. En determinadas formas de realización se aplican los métodos a cánceres refractarios a hormonas o resistentes a la terapia. En determinadas formas de realización se aplican los métodos a cánceres metastásicos. Por ejemplo pueden utilizarse las comparaciones de expresión diferencial de la proteína N-cadherina y/o de mRNA para determinar la etapa de

un cáncer en un individuo que tiene un cáncer que expresa una proteína N-cadherina o un transcripto de mRNA.

[0083] En términos generales, el tratamiento implicará la administración repetida de los anticuerpos anti-N-cadherina, inmunoconjugados, inhibidores y preparaciones de siARN por intermedio de una vía de administración aceptable tal como IV (inyección intravenosa), con una dosis efectiva. Las dosis dependerán de diversos factores generalmente evaluados por la persona con pericia en la especialidad, lo que incluye sin limitación el tipo de cáncer y la gravedad, grado o etapa del cáncer, la afinidad de ligación y la semivida de los agentes utilizados, el grado de expresión de la N-cadherina en el paciente, la amplitud del antígeno de N-cadherina shed circulante, el nivel deseado para la concentración de anticuerpo en estado constante, la frecuencia del tratamiento, y la influencia de los agentes quimioterapéuticos utilizados en combinación con el método de tratamiento de la invención. Las dosis diarias típicas pueden variar entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/kg. Las dosis en el intervalo de 10-500 mg del mAb o inmunoconjugados por semana pueden ser efectivas y bien toleradas, si bien dosis semanales más elevadas pueden ser adecuadas y/o bien toleradas. El principal factor determinante en la definición de la dosis apropiada es la cantidad de un agente particular necesario para ser terapéuticamente efectivo

en un contexto particular. Pueden ser necesarias administraciones repetidas a efectos de lograr la inhibición o regresión del tumor. Las dosis de carga iniciales pueden ser más elevadas. La dosis de carga inicial puede administrarse en forma de una infusión. De manera similar pueden administrarse dosis de mantenimiento periódicas, con la condición de que la dosis inicial sea bien tolerada.

[0084] También es posible la administración directa de los agentes, y esto puede ser ventajoso en determinados contextos. Por ejemplo, para el tratamiento del carcinoma de vejiga es posible inyectar los agentes directamente en la vejiga. Dado que los agentes administrados directamente a la vejiga serán rápidamente eliminados por el paciente, puede ser posible utilizar anticuerpos no humanos o quiméricos de manera efectiva sin complicaciones significativas de antigenicidad.

[0085] La invención también proporciona vacunas formuladas para contener una proteína N-Cadherina o uno de sus fragmentos. El uso de un antígeno tumoral en una vacuna para generar una inmunidad mediada por células para usar en una terapia anticáncer es bien conocido en la técnica y, por ejemplo, se empleó en cáncer de próstata usando PSMA humano e inmunógenos PAP de roedores (Hodge et al., 1995, Int. J. Cancer 63: 231-237; Fong et al., 1997, J. Immunol. 159: 3113-3117). Estos métodos se pueden practicar con facilidad empleando una

proteína N-Cadherina o uno de sus fragmentos o una molécula de ácido nucleico que codifica una N-Cadherina y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar apropiadamente el inmunógeno de N-Cadherina.

[0086] Por ejemplo, se pueden usar sistemas de suministro de genes virales para proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica la N-Cadherina. Los diversos sistemas de suministro de genes virales que se pueden usar en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitación, vacunas, fowlpox, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, virus adenoasociados, lentivirus y sindbus virus (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663). También se pueden usar sistemas de suministro no virales empleando ADN desnudo que codifica una proteína N-Cadherina o uno de sus fragmentos introducidos en el paciente (por ejemplo, por vía intramuscular) para inducir una respuesta antitumoral. En una forma de realización, se puede emplear un cADN de N-Cadherina humano de longitud total. En otra forma de realización, se pueden emplear moléculas de ácido nucleico de N-Cadherina que codifican epitopos de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos. Los epitopos CTL se pueden determinar usando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) para identificar péptidos dentro de una proteína N-cadherina

que son capaces de unirse óptimamente con alelos de HLA especificados.

[0087] Se pueden emplear también diversas estrategias ex vivo. Un enfoque incluye el uso de células dendríticas para presentar antígenos de N-Cadherina a un sistema inmune del paciente. Las células dendríticas expresan MHC de clase I y II, coestimulador B7 e IL-12 y, por ello, son células altamente especializadas que presentan antígeno. En cáncer de próstata, se pueden usar células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos de la N-Cadherina para estimular los sistemas inmunes de los pacientes con cáncer de próstata (Tjoa et al., 1996, Prostate 28: 65-69; Murphy et al., 1996, Prostate 29: 371-380). Las células dendríticas se pueden usar para presentar péptidos de N-Cadherina a las células T en el contexto de moléculas de MHC de clase I y II. En una forma de realización, las células dendríticas autólogas se pulsan con péptidos de N-Cadherina capaces de unirse con moléculas de MHC. En otra forma de realización, las células dendríticas se pulsan con la proteína N-Cadherina completa. Otra forma de realización más incluye la manipulación por ingeniería de la expresión del gen de N-Cadherina en las células dendríticas usando diversos vectores implementados conocidos en la técnica, tales como adenovirus (Arthur et al., 1997, Cancer Gene Ther. 4: 17-25), retrovirus (Henderson et al., 1996, Cancer Res. 56: 3763-3770),

lentivirus, virus adenoasociados, transfección de ADN (Ribas et al., 1997, Cancer Res. 57: 2865-2869) y transfección de ARN derivada de tumores (Ashley et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 1177-1182).

[0088] También se pueden usar anticuerpos antiidiotípicos de anti-N-Cadherina en la terapia anticáncer como una vacuna para inducir una respuesta inmune a células que expresan una proteína N-Cadherina, respectivamente. De modo específico, la generación de anticuerpos antiidiotípicos es bien conocida en el arte y se puede adaptar con facilidad para generar anticuerpos antiidiotípicos anti-N-Cadherina que imitan respectivamente un epítopo en una proteína N-Cadherina (ver, por ejemplo, Wagner et al., 1997, Hybridoma 16: 33-40; Foon et al., 1995, J Clin Invest 96: 334-342; Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43: 65-76). Tal anticuerpo antiidiotípico se puede usar en terapia antiidiotípica como se practica actualmente con otros anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra antígenos tumorales.

[0089] Se pueden emplear métodos de inmunización genéticos para generar respuestas inmunes humorales y celulares preventivas o terapéuticas dirigidas con células cancerosas que expresan N-Cadherina. Usando las moléculas de ADN que codifican la N-Cadherina descritas en la presente, se pueden inyectar constructos que comprenden ADN que codifica una proteína N-

Cadherina/inmunógeno y secuencias de regulación apropiadas directamente en el músculo o la piel de un individuo, de modo que las células del músculo o la piel absorba el constructo y exprese la proteína N-Cadherina/inmunógeno codificada. La proteína N-Cadherina/inmunógeno se puede expresar como una proteína de superficie celular o se puede secretar. La expresión de la proteína N-Cadherina/inmunógeno resulta en la generación de inmunidad humoral y celular preventiva o terapéutica contra cáncer de próstata. Se pueden usar diversas técnicas de inmunización genética preventivas y terapéuticas conocidas en el arte (para reseña, ver información y referencias publicadas en el sitio de Internet www.genweb.com).

[0090] La invención también proporciona métodos para inhibir la actividad celular (por ejemplo, proliferación, activación o propagación celular) de una célula que expresa múltiples antígenos de N-Cadherina sobre su superficie celular. Este método comprende la reacción de los inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, una mezcla heterogénea u homogénea) con la célula, de modo que los antígenos de N-Cadherina en la superficie celular forman un complejo con los inmunoconjugados. Cuanto mayor sea la cantidad de antígenos de N-Cadherina sobre la superficie celular, mayor será la cantidad de complejos de anticuerpos de N-Cadherina que se pueda usar, respectivamente.

A mayor cantidad de complejos de anticuerpos de N-Cadherina, mayor cantidad de actividad celular que se inhibe.

[0091] Una mezcla heterogénea incluye anticuerpos de N-Cadherina que reconocen diferentes o el mismo epitopo, conjugando cada anticuerpo con el mismo agente terapéutico o uno diferente. Una mezcla homogénea incluye anticuerpos que reconocen el mismo epitopo, conjugando cada anticuerpo con el mismo agente terapéutico.

[0092] La invención también proporciona métodos para inhibir la actividad biológica de N-Cadherina bloqueando respectivamente la N-Cadherina de la unión con su receptor. Los métodos comprenden poner en contacto una cantidad de N-Cadherina con un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención en condiciones que permitan un complejo de inmunoconjugado de N-Cadherina o anticuerpo de N-Cadherina bloqueando, respectivamente, la N-Cadherina de su unión con su ligando e inhibiendo la actividad de la N-Cadherina.

[0093] En algunas formas de realización, la invención proporciona un método de tratamiento de cáncer, en particular un cáncer que expresa N-Cadherina o inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa una proteína N-Cadherina por tratamiento de un sujeto o puesta en contacto de la célula cancerosa con un anticuerpo o uno de sus fragmentos que reconoce y se une con la proteína N-Cadherina en una cantidad

efectiva para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa. En algunas formas de realización, la célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata o una célula de cáncer de vejiga. El anticuerpo contactado puede ser un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo quimérico. En algunas formas de realización, el anticuerpo quimérico comprende una región constante de inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano o comprende una región constante de inmunoglobulina humana. En otras formas de realización, el fragmento de anticuerpo comprende Fab, F(ab)₂ o Fv. En otras formas de realización, el fragmento comprende una proteína recombinante que tiene una región de unión a antígeno.

[0094] En otra forma de realización, la invención proporciona métodos para el tratamiento de cáncer, en particular, un cáncer que expresa N-Cadherina o inhibe selectivamente una célula que expresa un antígeno de N-Cadherina por reacción de cualquier o una combinación de los immunoconjugados de la invención con la célula en una cantidad suficiente para inhibir la célula. Estas cantidades incluyen una cantidad para matar la célula o una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento o la proliferación celular. Tal como se comentó más arriba, la dosis y el régimen posológico dependerá de la naturaleza de la enfermedad o trastorno por tratar asociado con N-Cadherina, su población, el sitio al que

se han de dirigir los anticuerpos, las características de la inmunotoxina particular y el paciente. Por ejemplo, la cantidad de inmunoconjugado puede estar en el rango de 0,1 a 200 mg/kg de peso de paciente. El inmunoconjugado puede comprender el anticuerpo de anti-N-Cadherina o el fragmento ligado con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un agente citotóxico. El agente citotóxico se puede seleccionar de un grupo que consiste en ricina, cadena de ricina A, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina de difteria, exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, gelonina mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de saponaria officinalis, maitansinoides y glucocorticoidricina. El agente terapéutico puede ser un isótopo radiactivo. El isótopo terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en ^{212}Bi , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

[0095] En cualquiera de las formas de realización anteriores, también se puede administrar un fármaco quimioterapéutico y/o radioterapia. En algunas formas de realización, el paciente también recibe terapia de antagonistas hormonales. La puesta en contacto del paciente con el

anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede hacer administrando el anticuerpo al paciente por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral o intradérmica. En algunas formas de realización, el paciente tiene cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de próstata). En algunas formas de realización de las anteriores, el paciente sufre de cáncer de próstata y opcionalmente también el paciente recibe terapia por ablación. En algunas formas de realización, la puesta en contacto comprende la administración del anticuerpo directamente en el cáncer o una metástasis del cáncer.

[0096] En algunas formas de realización, el inmunoconjugado tiene un agente citotóxico que es una molécula pequeña. Las toxinas tales como maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o calicheamicina y sus análogos o derivados también son apropiados. Otros agentes citotóxicos que se pueden conjugar con los anticuerpos de anti-N-Cadherina incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos también se pueden usar. Los restos radioefectores se pueden incorporar en el conjugado por vías conocidas (por ejemplo, ligadores bifuncionales, proteínas de fusión). Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con un resto de efector que es una enzima que convierte un profármaco en un

agente quimioterapéutico activo. Ver el documento WO 88/07378; patente U. S. N.º 4.975.278; y patente U.S. N.º 6.949.245. El anticuerpo o inmunoconjugado se puede ligar opcionalmente a polímero no proteicos (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol).

[0097] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden preparar usando métodos bien conocidos en el arte (ver la patente U.S. N.º 6.949.245). Por ejemplo, los conjugados se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas funcionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidilsuberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolyen 2,6-diisocianato) y compuestos fluorados bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina ricina tal como se describe en Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminepentaacético

rotulado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Ver el documento WO 94/11026. El ligador puede ser un "ligador clivable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se pueden usar un ligador lábil a ácidos, ligador sensible a peptidasa, ligador de dimetilo o ligador con contenido de disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Métodos de administración y formulación

[0098] Los anticuerpos anti-N-cadherina o los immunoconjugados se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, en forma de un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo. La administración puede ser local o sistémica.

[0099] Las composiciones para administración comprenderán habitualmente un agente descrito en la presente (por ejemplo, inhibidores de la N-cadherina, anticuerpos de N-cadherina e

inmunokonjugados, siARN de N-cadherina y vectores de ellos) disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente en un vehículo acuoso. Puede utilizarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas y similares. Estas soluciones son estériles y en términos generales están exentas de material indeseable. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en la medida de lo requerido para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes para ajustar y tamponar el pH, agentes ajustadores de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactato de sodio y similares. La concentración del agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará primariamente en base a los volúmenes del fluido, viscosidades, peso corporal, y similares de acuerdo con el modo de administración particular de administración seleccionado y de las necesidades el paciente.

[0100] Por lo tanto, una composición farmacéutica típica para administración intravenosa variará en función del agente. Los métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos de la persona con pericia en

la especialidad o evidentes para la persona con pericia en la especialidad y se han descrito con mayor detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[0189] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosis unitarias en función del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosis unitarias incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, capsulas y pastillas. Se reconoce que los anticuerpos, si se los administra oralmente, deberían estar protegidos contra la digestión. Esto se lleva a cabo típicamente sea formando complejos de las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o envasando las moléculas en un vehículo adecuadamente resistente, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger los agentes contra la digestión son bien conocidos en la especialidad.

[0101] Las formulaciones farmacéuticas, en particular, de los anticuerpos e immunoconjugados e inhibidores destinados a ser utilizados en la presente invención pueden prepararse mediante el mezclado de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con opcionalmente vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables. Tales formulaciones pueden ser formulaciones liofilizadas o

soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores, farmacéuticamente aceptables, carecen de toxicidad para los receptores destinatarios en las dosis y concentraciones utilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores, farmacéuticamente aceptables, pueden ser acetato, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico) polipéptidos, agentes de conservación de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero o gelatina, o polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; y aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes; y surfactantes iónicos y no iónicos (por ejemplo, polisorbato); contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos. El anticuerpo puede ser formulado con una concentración de entre 0.5 - 200 mg/ml, o entre 10-50 mg/ml.

[0102] La formulación también puede proveer compuestos activos adicionales que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, citoquinas, agentes inhibidores del desarrollo, y agentes antihormonales. Los ingredientes activos también pueden prepararse en forma de preparaciones de liberación prolongada (por ejemplo, matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos (por ejemplo, poliésteres,

hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos. Los anticuerpos e immunoconjugados también pueden estar atrapados en micro cápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, micro cápsulas de hidroximetilcelulosa o micro cápsulas de gelatina y micro cápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales para la entrega de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

[0103] Las composiciones pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que adolece de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para esta utilización dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Es posible administrar administraciones simples o múltiples de la composición en función de la dosis y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. Un "paciente" o "sujeto" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, en particular mamíferos. Por lo tanto los métodos pueden aplicarse tanto para fines de terapia humana

como veterinaria. En la forma de realización preferida el paciente es un mamífero, preferentemente un primate, y en la forma de realización más preferida el paciente es un ser humano. Es posible utilizar otras terapias de cáncer conocidas en combinación con los métodos de la invención. Por ejemplo, las composiciones para utilizar de acuerdo con la invención también pueden utilizarse para apuntar a o sensibilizar una célula a otros agentes terapéuticos para cáncer tales como 5FU, vinblastina, actinomicina D, cisplatino, metotrexato, y similares.

[0104] En otras formas de realización, los métodos de la invención con otras terapias de cáncer (por ejemplo, prostatactomía radical), terapia de radiación (haz exterior o braquiterapia)), terapia de hormonas (por ejemplo, orquiectomía, terapia con LHRH-análogo para suprimir la producción de testosterona, terapia anti-andrógeno), o quimioterapia. La prostatactomía radical implica la remoción de la totalidad de la glándula próstata y además algo de tejido rodeante. Se utiliza este tratamiento comúnmente cuando se considera que el cáncer no se ha propagado más allá del tejido. Se utiliza comúnmente la terapia de radiación para tratar un cáncer de próstata que está todavía confinado a la glándula próstata, o que se ha propagado al tejido circundante. Si la enfermedad está más avanzada puede utilizarse la radiación para

reducir el tamaño del tumor. Se emplea frecuentemente la terapia de hormona en los pacientes en los que el cáncer de próstata se ha propagado más allá de la próstata o tiene una recurrencia. El objetivo de la terapia hormonal es la de reducir los niveles de las hormonas masculinas, los andrógenos y con ello hacer que el cáncer de próstata se contraiga o crezca más lentamente. Los agonistas de LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone, hormona liberadora de la hormona luteinizante) disminuyen la producción de testosterona. Estos agentes pueden inyectarse sea mensualmente sea a intervalos más prolongados. Dos de estos análogos son el leuprolide y goserelin. También pueden utilizarse antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida y nilutamida). La expresión "bloqueo total de andrógeno" se refiere al uso de antiandrógenos en combinación con la orquietomía o análogos de LHRH. La quimioterapia es una opción para pacientes cuyo cáncer de próstata se ha propagado fuera de la glándula próstata y para los que la terapia hormonal ha fallado. No se espera destruir la totalidad de las células de cáncer, pero puede ralentizar el desarrollo del tumor y aliviar el dolor. Algunos de los fármacos de quimioterapia utilizados en el tratamiento del cáncer de próstata que ha regresado o sigue creciendo y se propaga después del tratamiento con terapia hormonal incluyen doxorubicina (adriamicina), estramustina, etopósido,

mitoxantrona, vinblastina y paclitaxel. Es frecuente que se administren dos o más fármacos juntos a efectos de reducir la probabilidad de que las células de cáncer se hagan resistentes a la quimioterapia. El carcinoma de células pequeñas es un tipo raro de cáncer de próstata del que es probable que reaccione más a la quimioterapia que a la terapia hormonal.

[0105] En algunas formas de realización, también se administra un "cardioprotector" junto con el anticuerpo de N-cadherina, inhibidor de ligación de N-cadherina, o molécula de N-cadherina siARN para su uso de acuerdo con la invención (Véase la Patente de los EE.UU. N.º 6.949.245). Un cardioprotector es un compuesto o composición que impide o reduce la disfunción del miocardio (es decir, la cardiomiopatía y/o la insuficiencia cardíaca congestiva) asociada con la administración de un fármaco, tales como un antibiótico antraciclina a un paciente. El cardioprotector puede, por ejemplo, bloquear o reducir un efecto cardiotóxico mediado por radicales libres y/o prevenir o reducir la lesión por stress oxidativo. Los ejemplos de cardioprotectores abarcados por la presente definición incluyen el agente quelante de hierro dexrazoxane (ICRF-187) (Seifert et al. The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072 (1994)); un agente reductor de los lípidos y/o anti-oxidante tal como probucol (Singal et al. J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063 (1995)); amifostina (aminotiol

2-[(3-aminopropil)amino]etanotiol-dihidrógeno fosfato éster, también denominado WR-2721, y la ingestión celular defosforilada de la misma denominada WR-1065) y el ácido S-3-(3-metilaminopropilamino)propilfosfotioico (WR-151327), véase Green et al. *Cáncer 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 tales como metoprolol (Hjalmarson et al. *Drugs* 47:Suppl 4:31-9 (1994); y Shaddy et al. *Am. Heart J.* 129:197-9 (1995)); vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); agentes secuestradores de radicales libres tales como ácido oleanólico, ácido ursólico y N-acetilcisteína (NAC); compuestos atrapadores de espín tales como alfa-fenil-ter-butilnitrona (PBN) (Paracchini et al., *Anticáncer Res.* 13:1607-1612 (1993)); compuestos selenoorgánicos tales como P251 (Elbesen); y similares.

[0106] Las administraciones combinadas incluyen la administración conjunta, para lo cual se utilizan formulaciones separadas o una única composición farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde hay preferentemente un periodo de tiempo mientras ambos agentes activos (o todos ellos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[0107] Las moléculas y compuestos identificados que indirectamente o directamente modulan la expresión y/o función

de una proteína N-cadherina pueden ser útiles para tratar cánceres que respectivamente, expresan la N-cadherina. Los moduladores de la proteína N-cadherina puede ser administrados solos o conjuntamente en combinación con la quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia convencionales, así como con los métodos terapéuticos actualmente desarrollados..

[0108] Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del ácido nucleico empacado suspendido en diluentes, tales como agua, solución fisiológica salina o PEG 400; (b) cápsulas, sachets o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de los comprimidos pueden incluir uno o más de los siguientes: lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, acceso esteárico, y otros excipientes, colorantes, rellenos, ligantes, diluyentes, agentes tamponantes de soluciones, agentes de humectación, agentes conservadores, agentes saborizantes, tintes, agentes de desintegración, y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de tabletas pueden comprender el ingrediente activo en un saborizante, por

ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tales como gelatina y glicerina o suspensiones de sacarosa y acacia, y similares que contienen, además del ingrediente activo, vehículos conocidos de la persona con pericia en la especialidad.

[0109] El compuesto elegido, solo o en combinación con otros compuestos adecuados, puede ser preparado como formulaciones de aerosol (es decir, se lo puede "nebulizar") a ser administradas vía inhalación. Las formulaciones de aerosol puede ser colocados en agentes propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

[0110] Las formulaciones adecuadas para la administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios que consisten en el ácido nucleico envasado con una base de supositorio. Las bases adecuadas para los supositorios incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos parafina. Además de ello, es también posible utilizar capsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación del compuesto elegido con una base, lo que incluye, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles, e hidrocarburos de parafina.

[0111] Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen

soluciones acuosas y no acuosas, isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones en solución, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes de espesamiento, estabilizantes, y agentes de conservación. En la práctica de esta invención, es posible administrar las soluciones por ejemplo, por infusión intravenosa, o por administración oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral, la administración oral, y la administración intravenosa son los métodos de administración preferidos. Las formulaciones de los compuestos pueden ser presentadas en contenedores sellados de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas y frascos.

[0112] Las soluciones y suspensiones para inyecciones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo arriba descrito. Las células transducidas por ácidos nucleicos para la terapia ex vivo también pueden administrarse por vía intravenosa o parenteral como arriba descrito.

[0113] Es preferible que la preparación farmacéutica se halle en forma de dosis unitaria. En una forma de este tipo la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen

cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosis unitarias puede ser una preparación envasada; el envase contiene cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos, capsulas envasados, y polvos en frascos o ampollas. Por otra parte, la forma de dosis unitaria puede ser una capsula, comprimido, cachet, o tabletas por si mismo, o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de ellos en forma envasada. Si se desea, la composición puede también contener otros agentes terapéuticos adecuados.

[0114] Las preparaciones farmacéuticas entregan uno o más moduladores de la proteína N-cadherina, opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inmunoterapéuticos, en una formulación de liberación prolongada. Típicamente, se administra el modulador de la N-cadherina terapéuticamente como un agente de sensibilización que incrementa la sensibilidad de las células tumorales con respecto a otras terapias citotóxicas contra el cáncer, lo que incluye la quimioterapia, terapia de radiación, inmunoterapia y terapia hormonal.

[0115] En el uso terapéutico para el tratamiento del cáncer, los moduladores o inhibidores de la N-cadherina utilizados en el método farmacéutico de la invención de la invención son administrados con una dosis inicial de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg por día. Puede utilizarse

un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Sin embargo, las dosis pueden variarse en función de las necesidades del paciente, la gravedad de la condición que se está tratando, y del compuesto que se está empleando. Por ejemplo, es posible determinar las dosis empíricamente teniendo en cuenta el tipo y la etapa del cáncer diagnosticado en un paciente en particular. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. La magnitud de la dosis también será determinada por la existencia, naturaleza y amplitud de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un vector en particular, o de un tipo de célula transducida en un paciente en particular. La determinación de la dosis correcta para una situación en particular se halla dentro de la capacidad de la persona con pericia en la especialidad. En términos generales se inicia el tratamiento con dosis más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Seguidamente se incrementa la dosificación de a pequeños incrementos hasta lograr el efecto óptimo bajo las

circunstancias. Por razones de comodidad es posible dividir la dosis diaria administrada en porciones durante el día, si se desea.

[0116] Las preparaciones farmacéuticas (por ejemplo, N-cadherina siARNs, anticuerpos de N-cadherina, vacunas de N-cadherina, inhibidores de N-cadherina, e inmunoconjugados) para uso de acuerdo con la invención, se entregan típicamente a un mamífero, lo que incluye animales humanos y no humanos. Los mamíferos no humanos tratados mediante los métodos de la presente incluyen animales domesticados (es decir, caninos, felinos, roedores, y lagomorfos) y animales de ganadería y agricultura (bovinos, equinos, ovinos, porcinos).

Ensayos para moduladores de la proteína N-Cadherina

[0117] La modulación de una proteína N-Cadherina y la correspondiente modulación de una proliferación celular, por ejemplo, célula tumoral, se puede evaluar usando una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo modelos a base de células. Estos ensayos se pueden usar para evaluar inhibidores y activadores de una proteína N-Cadherina, y, en consecuencia, inhibidores y activadores de la proliferación celular, incluyendo moduladores de sensibilidad y toxicidad quimioterapéutica. Estos moduladores de una proteína N-

Cadherina son de utilidad para el tratamiento de trastornos relacionados con la proliferación celular patológica, por ejemplo, cáncer. Los moduladores de la proteína N-Cadherina se ensayan usando ya sea N-Cadherina recombinante o natural, con preferencia N-Cadherina humana.

[0118] La medición de la modulación de la proliferación celular con una proteína N-Cadherina o una célula que expresa una proteína N-Cadherina, ya sea recombinante o natural, se puede llevar a cabo usando una variedad de ensayos, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, tal como se describe en la presente. Se puede usar un cambio físico, químico o fenotípico apropiado que afecte la actividad, por ejemplo, la actividad enzimática como actividad de quinasa, la proliferación celular o la unión a ligando (por ejemplo, un receptor de proteína N-Cadherina) para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre el polipéptido de esta invención. Cuando los efectos funcionales se determinan usando células intactas o animales, también se pueden medir una variedad de efectos tales como unión a ligandos, actividad de quinasa, cambios transcripcionales en marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, northern blots), cambios en el metabolismo celular, cambios relacionados con la proliferación celular, expresión del marcador sobre la superficie celular, síntesis de ADN, marcador y dilución de la tintura (por ejemplo, ensayos de GFP

y tracker celular), inhibición del contacto, crecimiento tumoral en ratones desnudos, etc.

Ensayos in vitro

[0119] Los ensayos para identificar compuestos con actividad moduladora de N-Cadherina se pueden llevar a cabo *in vitro*. Tales ensayos pueden usar una proteína N-Cadherina de longitud total o una de sus variantes (ver, *por ejemplo*, las Figuras 6 y 7, respectivamente) o uno de sus mutantes o un fragmento de una proteína N-Cadherina. La proteína N-Cadherina purificada recombinante o natural se puede usar en los métodos *in vitro* de la invención. Además de la proteína N-Cadherina purificada, la proteína N-Cadherina recombinante o natural puede ser parte de un lisado celular o una membrana celular. Tal como se describe más abajo, el ensayo de unión puede ser en estado sólido o soluble. Con preferencia, la proteína o membrana se liga a un soporte sólido, ya sea de forma covalente o no covalente. A menudo, los ensayos *in vitro* de la invención son ensayos de unión o afinidad al sustrato o ligando, ya sea no competitivos o competitivos. Otros ensayos *in vitro* incluyen cambios de medición en las propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad para la proteína. Otros ensayos *in vitro* incluyen

ensayos de actividad enzimática, tales como fosforilación o ensayos de autofosforilación).

[0120] En una forma de realización, se realiza un ensayo de unión de alto rendimiento en el que la proteína N-Cadherina o uno de sus fragmentos se pone en contacto con un modulador potencial y se incuba durante un tiempo apropiado. En una forma de realización, el modulador potencial se liga a un soporte sólido y la proteína N-Cadherina se añade. En otra forma de realización, la proteína N-Cadherina se liga a un soporte sólido. Se puede usar una amplia variedad de moduladores tal como se describe más abajo, incluyendo pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, anticuerpos y análogos del ligando de N-Cadherina. Se puede usar una amplia variedad de ensayos para identificar la unión de modulador de N-Cadherina, incluyendo ensayos de unión rotulada de proteína-proteína, desplazamientos de movilidad electroforética, inmunoensayos, ensayos enzimáticos tales como ensayos de quinasas y similares. En algunos casos, la unión con el modulador candidato se determina a través del uso de ensayos de unión competitivos, donde la interferencia con la unión con un ligando o sustrato conocido se mide en presencia de un modulador potencial.

[0121] En una forma de realización, las placas de microtitulación se recubren primero con una proteína N-Cadherina o un receptor de proteína N-Cadherina y luego se

exponen a uno o varios compuestos de ensayo potencialmente capaces de inhibir la unión de una proteína N-Cadherina con un receptor de proteína N-Cadherina. Un par de unión rotulado (es decir, isótopo fluorescente, enzimático, radiactivo) de la proteína recubierta, ya sea un receptor de proteína N-Cadherina o una proteína N-Cadherina, se expone luego a la proteína recubierta y los compuestos de ensayo. La proteína no ligada se lava de ser necesario entre exposiciones a una proteína N-Cadherina, un receptor de proteína N-Cadherina o un compuesto de ensayo. La ausencia de señal detectable indica que el compuesto de ensayo inhibía la interacción de unión entre una proteína N-Cadherina y, respectivamente, un receptor de proteína N-Cadherina. La presencia de una señal detectable (es decir, fluorescencia, colorimetría, radiactividad) indica que el compuesto de ensayo no inhibía la interacción de unión entre una proteína N-Cadherina y, respectivamente, un receptor de proteína N-Cadherina. La presencia o ausencia de señal detectable se compara con una muestra de control que no se expuso a un compuesto de ensayo, que exhibe una señal no inhibida. En algunas formas de realización, el par de unión no está rotulado, pero está expuesto a un anticuerpo rotulado que se une específicamente con el par de unión.

Ensayos in vivo a base de células

[0122] En otra forma de realización, la proteína N-Cadherina se expresa en una célula y los cambios funcionales, por ejemplo, físicos y químicos o fenotípicos se ensayan para identificar la N-Cadherina y los moduladores de la proliferación celular, por ejemplo, proliferación de células tumorales. Las células que expresan proteínas N-Cadherina también se pueden usar en ensayos de unión y ensayos enzimáticos. Cualquier efecto funcional apropiado se puede medir tal como se describe en la presente. Por ejemplo, la morfología celular (por ejemplo, volumen celular, volumen nuclear, perímetro celular y perímetro nuclear), unión de ligando, actividad de quinasa, apoptosis, expresión del marcador de superficie celular, proliferación celular, positividad de GFP y ensayos de dilución de tintura (por ejemplo, ensayos de tracker celular con tinturas que se unen a las membranas celulares), ensayos de síntesis de ADN (por ejemplo, tinturas de unión a ADN de ^3H -timidina y fluorescente como tintura BrdU o Hoechst con análisis FACS), son todos ensayos apropiados para identificar potenciales moduladores usando un sistema a base de células. Las células apropiadas para tales ensayos a base de células incluyen células de cáncer primario o células tumores y líneas celulares, tal como se

describen en la presente, por ejemplo, A549 (pulmón), MCF7 (mama, p53 de tipo salvaje), H1299 (pulmón, p53 cero), Hela (cervical), PC3 (próstata, p53 mutante), MDA-MB-231 (mama, p53 de tipo salvaje). Las líneas celulares de cáncer pueden ser p53 mutante, p53 cero o expresan p53 de tipo salvaje. La proteína N-Cadherina puede ser natural o recombinante. Además, los fragmentos de N-Cadherina o proteínas N-Cadherina quiméricas se pueden usar en ensayos a base de células.

[0123] Los niveles de polipéptido de N-Cadherina celulares se pueden determinar midiendo el nivel de proteína o mRNA. El nivel de la proteína N-Cadherina o las proteínas relacionadas con la N-Cadherina se miden usando inmunoensayos tales como western blotting, ELISA y similares con un anticuerpo que se une de forma selectiva, respectivamente, con el polipéptido de N-Cadherina o uno de sus fragmentos. Para la medición de mRNA, amplificación, por ejemplo, usando ensayos de PCR, LCR o hibridación, por ejemplo, hibridación northern, protección de ARNasa, dot blotting, son los preferidos. El nivel de proteína o mRNA se detecta usando agentes de detección de rotulación directa o indirecta, por ejemplo, ácidos nucleicos rotulados de forma fluorescente o radiactiva, anticuerpos rotulados de forma radiactiva o enzimática y similares, tal como se describe en la presente.

[0124] De modo alternativo, la expresión de N-Cadherina se puede medir usando un sistema de genes reporteros. Dicho sistema se puede prever usando un promotor de proteína N-Cadherina ligado operativamente a un gen reportero como acetiltransferasa de cloranfenicol, firefly luciferasa, luciferasa bacteriana, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina. Por otra parte, la proteína de interés se puede usar como un reportero indirecto por unión con un segundo reportero como una proteína fluorescente roja o verde (ver, por ejemplo, Mistili & Spector, *Nature Biotechnology* 15:961-964 (1997)). El constructo reportero se transfectar típicamente en una célula. Después del tratamiento con un modulador potencial, la cantidad de transcripción, traducción o actividad del gen reportero se mide de acuerdo con técnicas estándar conocidas por el experto en el arte.

Modelos animales

[0125] Los modelos animales de proliferación celular también se usan en el control de moduladores de la proliferación celular. De modo similar, la tecnología con animales transgénicos que incluyen tecnología de knockout génico, por ejemplo como resultado de recombinación homóloga con un vector de direccionamiento génico apropiado o sobreexpresión génica,

dará como resultado la ausencia o una mayor expresión de la proteína N-Cadherina. La misma tecnología también se puede aplicar para preparar células knock-out. Si se desea, puede ser necesaria una expresión específica de tejido o knockout de la proteína N-Cadherina. Los animales transgénicos generados por tales métodos se usan como modelos animales de proliferación celular y son de utilidad adicionalmente en el control de moduladores de la proliferación celular.

[0126] Las células knock-out y los ratones transgénicos se pueden preparar por inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en un sitio génico endógeno de N-Cadherina en el genoma murino por recombinación homóloga. Estos ratones también se pueden preparar por sustitución de una N-Cadherina endógena, respectivamente, con una versión mutada del gen de N-Cadherina o, respectivamente, por mutación de una N-Cadherina endógena, por ejemplo, por exposición a carcinógenos.

[0127] Un constructo de ADN se introduce en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética recién manipulada por ingeniería se inyectan en un embrión murino huésped que se reimplanta en un receptor hembra. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la línea celular mutante. En consecuencia, al criar ratones quiméricos, es posible obtener una nueva línea de ratones que

contienen la lesión genética introducida (ver, por ejemplo, Capecchi et al., *Science* 244:1288 (1989)). Los ratones blanco quiméricos se pueden derivar de acuerdo con Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987) y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (2003).

Ensayos de ejemplo

Crecimiento de agar blando o formación de colonias en suspensión

[0128] Las células normales requieren de un sustrato sólido para unir y crecer. Cuando las células se transforman, pierden su fenotipo y crecen desprendidas del sustrato. Por ejemplo, las células transformadas pueden crecer en cultivo de suspensión agitado o suspendido en medio semisólido como agar semisólido o blando. Las células transformadas, cuando se transfectan con genes supresores tumorales, regeneran un fenotipo normal y requieren de un sustrato sólido para unirse y crecer.

[0129] El crecimiento en agar blando o la formación de colonias en ensayos en suspensión se pueden usar para

identificar moduladores de N-Cadherina. Típicamente, las células huésped transformadas (por ejemplo, células que crecen en agar blando) se usan en este ensayo. Por ejemplo se pueden usar líneas celulares RKO o HCT116. Las técnicas para el crecimiento en agar blando o la formación de colonias en ensayos en suspensión se describen en Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss, New York (1994), incorporados en la presente por referencia. Ver también la sección de métodos de Garkavtsev et al. (1996), *supra*, incorporada en la presente por referencia.

Inhibición del contacto y limitación de la densidad de crecimiento

[0130] Las células normales crecen típicamente en un patrón plano y organizado en una placa de Petri hasta que entran en contacto con otras células. Cuando las células se tocan entre sí, tienen el contacto inhibido y dejan de crecer. Cuando las células se transforman, sin embargo, las células no están en contacto inhibido y continúan creciendo hasta altas densidades en focos desorganizados. Así, las células transformadas crecen hasta una densidad de saturación mayor que las células normales. Esto se puede detectar morfológicamente por formación de una monocapa desorientada de células o células rodeadas en focos dentro de un patrón regular de células rodeadas normales.

De modo alternativo, se puede usar el índice de rotulación con [^3H]-timidina en la densidad de saturación para medir la limitación de la densidad de crecimiento. Ver Freshney (1994), *supra*. Las células transformadas, cuando entran en contacto con los moduladores de proliferación celular, regeneran un fenotipo normal y se vuelven con contacto inhibido y crecerán con una menor densidad.

[0131] La inhibición del contacto y la limitación de la densidad de los ensayos de crecimiento se pueden usar para identificar los moduladores de N-Cadherina que son capaces de inhibir la proliferación anormal y la transformación en las células huésped. Típicamente, las células huésped transformadas (por ejemplo, células que no tienen contacto inhibido) se usan en este ensayo. Por ejemplo, se pueden usar las líneas celulares RKO o HCT116. En este ensayo, el índice de rotulación con [^3H]-timidina en una densidad de saturación es un método preferido de medición de la limitación de densidad de crecimiento. Las células huésped transformadas entran en contacto con un modulador potencial de N-cadherina y se cultivan durante 24 horas en la densidad de saturación en condiciones de medios no limitativas. El porcentaje de rotulación de células con [^3H]-timidina se determina por autorradiografía. Ver Freshney (1994), *supra*. Las células huésped contactadas con un modulador de N-cadherina producirían

un menor índice de rotulación en comparación con el control (por ejemplo, células huésped transformadas transfectadas con un vector que carece de inserto).

Factor de crecimiento o serodependencia

[0132] El factor de crecimiento o la serodependencia se pueden usar como un ensayo para identificar los moduladores de N-cadherina. Las células transformadas tienen una menor serodependencia que sus contrapartes normales (ver, por ejemplo, Temin, *J. Natl. Cancer Inst.* 37:167-175 (1966); Eagle *et al.*, *J. Exp. Med.* 131:836-879 (1970)); Freshney, *supra*. Esto se debe en parte a la liberación de diversos factores por células transformadas. Cuando las células transformadas se ponen en contacto con un modulador de N-Cadherina, las células readquirirán serodependencia y liberarán los factores de crecimiento en un menor nivel.

Niveles de marcadores específicos de tumores

[0133] Las células tumorales liberan una mayor cantidad de ciertos factores (de ahora en adelante, "marcadores específicos de tumores") que sus contrapartidas normales. Por ejemplo, el activador de plasminógeno (PA) se libera de glioma humano en un mayor nivel que de células cerebrales normales (ver, por

ejemplo, Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization and potential interference with tumor growth*. En Mihich (ed.): "Biological Responses in Cancer". New York, Academic Press, pp. 178-184 (1985)). De modo similar, el factor de angiogénesis tumoral (TAF) se libera en un mayor nivel en células tumorales que sus contrapartes normales. Ver, por ejemplo, Folkman, *Angiogenesis and cancer, Sem Cancer Biol.* (1992)).

[0134] Los marcadores específicos tumorales se pueden ensayar para identificar moduladores de N-Cadherina que reducen el nivel de liberación de estos marcadores de las células huésped. Típicamente, se usan células huésped transformadas o tumorigénicas. Se describen diversas técnicas que miden la liberación de estos factores en Freshney (1994), *supra*. Además, ver Unkless et al., *J. Biol. Chem.* 249:4295-4305 (1974); Strickland & Beers, *J. Biol. Chem.* 251:5694-5702 (1976); Whur et al., *Br. J. Cancer* 42:305-312 (1980); Gulino, *Angiogenesis, tumor vascularization and potential interference with tumor growth*. En Mihich, E. (ed): "Biological Responses in Cancer". New York, Plenum (1985); Freshney *Anticancer Res.* 5:111-130 (1985).

Invasividad en matrigel

[0135] Se puede usar el grado de invasividad en Matrigel u otro constituyente de matriz extracelular como un ensayo para identificar moduladores de N-Cadherina que son capaces de inhibir la proliferación celular anormal y el crecimiento tumoral. Las células tumorales exhiben una buena correlación entre malignidad e invasividad de células en Matrigel o algún otro constituyente de matriz extracelular. En este ensayo, se usan típicamente células tumorigénicas como células huésped. En consecuencia, los moduladores de N-Cadherina se pueden identificar midiendo los cambios en el nivel de invasividad entre las células huésped antes y después de la introducción de potenciales moduladores. Si un compuesto modula la N-Cadherina, su expresión en células huésped tumorigénicas afectará su invasividad.

[0136] Se pueden usar técnicas descritas en Freshney (1994), *supra*. En breve, el nivel de invasión de las células huésped se puede medir usando filtros recubiertos con Matrigel o algún otro constituyente de matriz extracelular. La penetración en el gel o a través del lado distal del filtro se considera invasividad y se considera histológicamente por cantidad de células y distancia movida o prerrotulando las células con ^{125}I y contando la radiactividad del lado distal del filtro o la

parte inferior de la placa. Ver, por ejemplo, Freshney (1984), *supra*.

Crecimiento tumoral in vivo

[0137] Los efectos de los moduladores de N-Cadherina sobre el crecimiento celular se pueden ensayar en ratones transgénicos o inmunosuprimidos. Los ratones transgénicos knock-out se pueden preparar, en los que se disrumpe el gen endógeno de N-Cadherina. Estos ratones knock-out se pueden usar para estudiar los efectos de la N-Cadherina, por ejemplo, como un modelo de cáncer, como un medio de ensayo *in vivo* de compuestos que modulan la N-Cadherina y para ensayar los efectos de restauración de una N-Cadherina de tipo salvaje o mutante en un ratón knock-out.

[0138] Las células knock-out y los ratones transgénicos se pueden preparar por inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio génico endógeno de N-Cadherina en el genoma de ratón por medio de recombinación homóloga. Estos ratones también se pueden preparar sustituyendo la N-Cadherina endógena con una versión mutada de N-Cadherina o mutando la N-Cadherina endógena, por ejemplo, por exposición a carcinógenos.

[0139] Se introduce un constructo de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión

genética manipulada nuevamente por ingeniería se inyectan en un embrión de ratón huésped que se reimplanta en un receptor hembra. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la línea celular mutante. En consecuencia, al cruzar los ratones quiméricos, es posible obtener una nueva línea de ratones con la lesión genética introducida (ver, por ejemplo, Capecchi et al., *Science* 244:1288 (1989)). Los ratones blanco quiméricos se pueden derivar de acuerdo con Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y *Teratocarcinomas and y Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987). Estos ratones knock-out se pueden usar como huéspedes para evaluar los efectos de diversos moduladores de N-Cadherina sobre el crecimiento celular.

[0140] De modo alternativo, se pueden usar diversos animales huésped inmunosuprimidos o inmunodeficientes. Por ejemplo, como huésped se pueden usar ratón "desnudo" genéticamente atímico (ver, por ejemplo, Giovanella et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 52:921 (1974)), un ratón SCID, un ratón timectomizado o un ratón irradiado (ver, por ejemplo, Bradley et al., *Br. J. Cancer* 38:263 (1978); Selby et al., *Br. J. Cancer* 41:52 (1980)). Las células tumorales transplantables (típicamente aprox. 10^6 células) inyectadas en huéspedes isogénicos

producirán tumores invasivos en alta proporción de casos, mientras que las células normales de origen similar no lo harán. Los huéspedes se tratan con moduladores de N-Cadherina, por ejemplo, por inyección. Después de un período de tiempo apropiado, con preferencia 4-8 semanas, se mide el crecimiento del tumor (por ejemplo, en volumen o en sus dos dimensiones más largas) y se comparan con el control. Se dice que los tumores que tenían una reducción estadísticamente significativa (usando, por ejemplo, la prueba T de Student) tienen un crecimiento inhibido. Al usar la reducción del tamaño del tumor como un ensayo, se pueden identificar moduladores de N-Cadherina que son capaces, por ejemplo, de inhibir la proliferación celular anormal.

Métodos de control

[0141] La presente invención también proporciona métodos de identificación de compuestos que inhiben la unión con una proteína N-Cadherina, respectivamente, un receptor de N-Cadherina, en donde dichos compuestos se usan en la inhibición del crecimiento y la promoción de la regresión de un tumor que expresa una proteína N-Cadherina, por ejemplo un tumor de cáncer urogenital, incluyendo un tumor de cáncer de próstata o de vejiga.

[0142] Usando los ensayos descritos con anterioridad, se pueden identificar compuestos líderes que son apropiados para ensayar luego la identificación de aquellos que son agentes terapéuticamente efectivos por control de una variedad de compuestos y mezclas de compuestos en cuanto a su capacidad de reducir, inhibir la unión de una proteína N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-Cadherina. Los compuestos de interés pueden ser sintéticos o naturales.

[0143] Los ensayos de control se pueden llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*. Típicamente, los ensayos de control iniciales se llevan a cabo *in vitro* y se pueden confirmar *in vivo* usando ensayos a base de células o modelos animales. Por ejemplo, las proteínas de la familia génica regenerativa están implicadas con la proliferación celular. En consecuencia, los compuestos que inhiben la unión de una proteína N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-Cadherina pueden inhibir la proliferación celular resultante de esta interacción de unión en comparación con células no expuestas a un compuesto de ensayo. Además, la unión de una proteína N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-Cadherina está implicada con las respuestas de lesión tisular, inflamación y displasia. En modelos animales, los compuestos que inhiben la unión de una proteína N-Cadherina, respectivamente, con su receptor, por ejemplo, pueden inhibir la curación de heridas o el avance de

displasia en comparación con un animal no expuesto a un compuesto de ensayo. Ver, *por ejemplo*, Zhang, *et al.*, *World J Gastroenter* (2003) 9:2635-41.

[0144] Usualmente, un compuesto que inhibe la unión de N-Cadherina, respectivamente, con un receptor de N-cadherina es sintético. Los métodos de control se diseñan para controlar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas de ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente a los ensayos que típicamente se corren en paralelo (*por ejemplo*, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos).

[0145] La invención proporciona ensayos *in vitro* para inhibir la unión de N-Cadherina con su receptor en un formato de alto rendimiento. Para cada uno de los formatos de ensayo descritos, las reacciones de control "sin modulador" que no incluyen un modulador proporcionan un nivel de fondo de N-Cadherina que une la interacción con su receptor o sus receptores. En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible controlar varios miles de moduladores diferentes en un día único. En particular, cada cavidad de una placa de microtitulación se puede usar para correr un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado o, si se han de observar los efectos de la concentración o el tiempo de incubación, cada 5-10 cavidades pueden ensayar un modulador

individual. Así, una placa de microtitulación estándar única puede ensayar aproximadamente 100 (96) moduladores. Si se usan placas de 1536 cavidades, entonces una placa única puede ensayar con facilidad de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 diferentes compuestos. Es posible ensayar diferentes placas por día; son posibles controles de ensayo de aproximadamente 6.000-20.000 e incluso hasta aproximadamente 100.000-1.000.000 diferentes compuestos usando los sistemas integrados de la invención. Las etapas de rotulación, adición de reactivos, cambios de fluidos y detección son compatibles con la automatización completa, por ejemplo, usando sistemas robóticos programables o "sistemas integrados" asequibles en comercios, por ejemplo, a través de BioTX Automation, Conroe, TX; Qiagen, Valencia, CA; Beckman Coulter, Fullerton, CA; y Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA.

[0146] Esencialmente cualquier compuesto químico se puede ensayar como un inhibidor potencial de N-Cadherina que se une con su receptor para usar en los métodos de la invención. Con máxima preferencia, se usan en general los compuestos que se pueden disolver en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente a base de DMSO). Se apreciará que haya varios proveedores de compuestos químicos, incluso Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland), así

como proveedores de bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas y péptidos listas para controlar, incluyendo Chembridge Corp. (San Diego, CA), Discovery Partners International (San Diego, CA), Triad Therapeutics (San Diego, CA), Nanosyn (Menlo Park, CA), Affymax (Palo Alto, CA), ComGenex (South San Francisco, CA) y Tripos, Inc. (St. Louis, MO).

[0147] En una forma de realización de preferencia, los inhibidores de la interacción de unión con el receptor de N-Cadherina se identifican por control de una biblioteca combinatoria que contiene una gran cantidad de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores potenciales). Estas "bibliotecas químicas o peptídicas combinatorias" se pueden controlar en uno o varios ensayos, tal como se describe en la presente, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que despliegan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos líderes" convencionales o se pueden usar en sí como agentes terapéuticos potenciales o reales.

[0148] Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, combinando una cantidad de "bloques de conformación" apropiados, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal como una biblioteca

de polipéptidos se forma combinando un grupo de bloques de conformación químicos (aminoácidos) en cualquier vía posible para una longitud de compuesto dado (es decir, la cantidad de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de tal mezcla combinatoria de bloques de conformación químicos.

[0149] La preparación y el control de bibliotecas químicas combinatorias son bien conocidos por los expertos en el arte. Estas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas de péptidos (ver, por ejemplo, patente U.S. 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493 (1991) y Houghton et al., *Nature* 354:84-88 (1991)). Otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química también pueden ser utilizadas. Estas químicas incluyen, pero sin limitación: peptoides (publicación PCT N.º WO 91/19735), péptidos codificados (publicación PCT WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (publicación PCT N.º WO 92/00091), benzodiazepinas (patente U.S. N.º 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con estructura de β -D-glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de

bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261:1303 (1993)), y/o peptidilfosfonatos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (ver Ausubel, Berger y Sambrook, *all supra*), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (ver, por ejemplo, patente U.S. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (ver, por ejemplo, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (ver, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science*, 274:1520-1522 (1996) y patente U.S. 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (ver, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, Jan 18, página 33 (1993); isoprenoides, patente U.S. 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente U.S. 5.549.974; pirrolidinas, patentes U.S. 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente U.S. 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514 y similares).

[0150] Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias son asequibles en comercios (ver, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

[0151] El diseño y la preparación de moléculas y vectores de siARN son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un proceso eficaz para diseñar un siARN apropiado es iniciar en el codón de partida AUG del transcripto de mRNA (por ejemplo, ver Figuras 7, 8, 9) y escanear las secuencias de dinucleótidos AA (ver Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888 (2001)). Cada nucleótido AA y 3' adyacentes son sitios blanco de siARN potenciales. La longitud de la secuencia de sitio adyacente determinará la longitud del siARN. Por ejemplo, 19 sitios adyacentes que darán siARN de 21 nucleótidos de longitud con dinucleótidos UU colgantes 3' son a menudo los más efectivos. Este enfoque también es compatible con el uso de ARN pol III para transcribir siARNs de horquilla. El ARN pol III termina la transcripción en los trectos poli(T) de 4 nucleótidos de manera de crear moléculas de ARN que tienen un corta cola poli(U). Sin embargo, los siARNs con otros sobrevuelos de dinucleótidos 3' terminales también pueden inducir de manera efectiva los ARNi, y es posible seleccionar la secuencia empíricamente. Para la selectividad, es posible evitar secuencias objetivo con más de 16 - 17 pares de bases contiguas de homología con respecto a otras secuencias codificadoras, para lo cual se lleva a cabo una búsqueda con BLAST (Véase, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

[0152] Los vectores de expresión de siARN para inducir ARNi pueden tener diferentes criterios de diseño. Un vector puede tener insertadas dos repeticiones invertidas separadas por una secuencia espaciadora corta y terminar con un tramo de T que sirven para terminar la transcripción. Se predice que el transcripto de ARN expresado se pliega en un siARN corto de horquilla. La selección de secuencia blanco de siARN, la longitud de las repeticiones invertidas que codifican el tallo de una horquilla putativa, el orden de las repeticiones invertidas, la longitud y la composición de la secuencia espaciadora que codifica el bucle de la horquilla y la presencia o ausencia de las pendientes 5' puede variar. Un orden preferido del casete de expresión de siARN es una cadena con sentido, un espaciador corto y una cadena antisentido. Los siARNs de horquilla con estas diversas longitudes de tallo (por ejemplo, 15 a 30) pueden ser apropiados. La longitud de los bucles que unen las cadenas con sentido y antisentido del siARN de horquilla puede tener longitudes variables (por ejemplo, 3 a 9 nucleótidos o más largos). Los vectores pueden contener promotores y mejoradores de la expresión u otros elementos de regulación que están operativamente ligados a la secuencia de nucleótidos que codifica el siARN. Estos elementos de control se pueden diseñar para permitir que el clínico inicie o termine

la expresión génica por adición o control de factores externos de los que son responsables los elementos de regulación.

[0153] En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa una proteína N-Cadherina al entrar en contacto la célula cancerosa con un anticuerpo o uno de sus fragmentos que reconoce y une la proteína en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa. En algunas formas de realización, la célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata o una célula de cáncer de vejiga. El anticuerpo de contacto puede ser un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo quimérico. En algunas formas de realización, el anticuerpo quimérico comprende una región constante de inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano o comprende una región constante de inmunoglobulina humana. En otras formas de realización, el fragmento de anticuerpo comprende Fab, F(ab)₂ o Fv. En otras formas de realización, el fragmento comprende una proteína recombinante que tiene una región de unión a antígeno. En otras formas de realización más, el anticuerpo o el fragmento es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o el fragmento ligado con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un agente citotóxico. El agente citotóxico se puede seleccionar de un grupo que consiste en

ricina, cadena de ricina A, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, gelonina mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de saponaria officinalis, maitansinoides y glucocorticoidricina. El agente terapéutico puede ser un isótopo radiactivo. El isótopo terapéutico se puede seleccionar el grupo que consiste en ^{212}Bi , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y y ^{186}Re . En cualquiera de las formas de realización anteriores, también se puede administrar una droga quimioterapéutica y/o radioterapia. En algunas formas de realización, el paciente también recibe terapia con antagonistas hormonales. La puesta en contacto del paciente con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede hacer administrando el anticuerpo al paciente por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral o intradérmica. En algunas formas de realización, el paciente tiene cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de próstata). En algunas formas de realización de las anteriores, el paciente sufre de cáncer de próstata y opcionalmente también el paciente recibe terapia por ablación. En algunas formas de realización, la puesta en contacto

comprende la administración del anticuerpo directamente en el cáncer o una metástasis del cáncer.

[0154] En algunas formas de realización, el inmunoconjugado tiene un agente citotóxico que es una molécula pequeña. Las toxinas tales como maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o calicheamicina y sus análogos o derivados también son apropiados. Otros agentes citotóxicos que se pueden conjugar con los anticuerpos de anti-N-Cadherina incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos también se pueden usar. Los restos radioefectores se pueden incorporar en el conjugado por vías conocidas (por ejemplo, ligadores bifuncionales, proteínas de fusión). Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con un resto de efector que es una enzima que convierte un profármaco en un agente quimioterapéutico activo. Ver el documento WO 88/07378; patente U. S. N.º 4.975.278. El anticuerpo o inmunoconjugado se puede ligar opcionalmente a polímero no proteicos (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol).

[0155] Las composiciones para administración comprenderán habitualmente un agente descrito en la presente disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente en un vehículo acuoso. Puede utilizarse una variedad de vehículos

acuosos, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas y similares. Estas soluciones son estériles y en términos generales están exentas de material indeseable. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en la medida de lo requerido para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes para ajustar y tamponar el pH, agentes ajustadores de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactato de sodio y similares. La concentración del agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará primariamente en base a los volúmenes del fluido, viscosidades, peso corporal, y similares de acuerdo con el modo de administración particular de administración seleccionado y de las necesidades el paciente.

[0188] Así, una composición farmacéutica típica para administración intravenosa puede proporcionar de aproximadamente 0,1 a 100 mg por paciente por día. Se pueden usar dosis de 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente por día. Son posibles dosis sustancialmente mayores en administración tópica. Los métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos

de la persona con pericia en la especialidad o evidentes para la persona con pericia en la especialidad y se han descrito con mayor detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[0189] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosis unitarias en función del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosis unitarias incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, capsulas y pastillas. Se reconoce que los anticuerpos, si se los administra oralmente, deberían estar protegidos contra la digestión. Esto se lleva a cabo típicamente sea formando complejos de las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o envasando las moléculas en un vehículo adecuadamente resistente, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger los agentes contra la digestión son bien conocidos en la especialidad.

[0156] Las formulaciones farmacéuticas, en particular, de los anticuerpos e immunoconjugados e inhibidores destinados a ser utilizados en la presente invención pueden prepararse mediante el mezclado de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con opcionalmente vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables. Tales

formulaciones pueden ser formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores, farmacéuticamente aceptables, carecen de toxicidad para los receptores destinatarios en las dosis y concentraciones utilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores, farmacéuticamente aceptables, pueden ser acetato, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico) polipéptidos, agentes de conservación de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero o gelatina, o polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; y aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes; y surfactantes iónicos y no iónicos (por ejemplo, polisorbato); contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos. El anticuerpo puede ser formulado con una concentración de entre 0.5 - 200 mg/ml, o entre 10-50 mg/ml.

[0157] La formulación también puede proveer compuestos activos adicionales que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, citoquinas, agentes inhibidores del desarrollo, y agentes antihormonales. Los ingredientes activos también pueden prepararse en forma de preparaciones de liberación prolongada (por ejemplo, matrices semipermeables de

polímeros hidrófobos sólidos (por ejemplo, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos. Los anticuerpos e inmunoconjugados también pueden estar atrapados en micro cápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, micro cápsulas de hidroximetilcelulosa o micro cápsulas de gelatina y micro cápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales para la entrega de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

[0190] Las composiciones que contienen los inhibidores y agentes de la invención (por ejemplo, anticuerpos) pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que adolece de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para esta utilización dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Es posible administrar administraciones simples o múltiples de la composición en función de la dosis y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. Un "paciente" o "sujeto" para los fines de la presente invención incluye tanto

seres humanos como otros animales, en particular mamíferos. Por lo tanto los métodos pueden aplicarse tanto para fines de terapia humana como veterinaria. En la forma de realización preferida el paciente es un mamífero, preferentemente un primate, y en la forma de realización más preferida el paciente es un ser humano. Es posible utilizar otras terapias de cáncer conocidas en combinación con los métodos de la invención. Por ejemplo, las composiciones para utilizar de acuerdo con la invención también pueden utilizarse para apuntar a o sensibilizar una célula a otros agentes terapéuticos para cáncer tales como 5FU, vinblastina, actinomicina D, cisplatino, metotrexato, y similares. En otras formas de realización, se pueden usar los métodos de la invención con radioterapia y similares.

EJEMPLOS

[0158] Los siguientes ejemplos se brindan para ilustrar pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

[0159] Los datos en la Figura 1 muestran que a pesar de que la N-cadherina se expresa sólo en un pequeño subgrupo de células independientes de andrógenos, ese tratamiento con anticuerpos es suficiente para retardar el crecimiento y la

progresión de tumores independientes de andrógenos (curvas de color rosa y amarillo). Estos datos sugieren que la población de N-cadherina de células se requiere para la formación de tumores independientes de andrógenos y que el bloqueo es suficiente para retardar la progresión del tumor. Estos datos son consistentes con una interpretación de que la N-cadherina marca una población de células madre independientes de andrógenos. El bloqueo del crecimiento de las células madre es suficiente para bloquear el crecimiento del tumor. Estos datos también muestran que los anticuerpos pueden funcionar sobre células que expresan niveles normales o incluso bajos de N-cadherina.

[0160] Tal como se indica en la Figura 2, se inyectaron células en ratones castrados y las células positivas de N-cadherina formaron tumores más rápida y eficazmente que la población negativa, lo cual sugiere que las células positivas de N-cadherina tienen una ventaja de crecimiento o tienen características de células madre y son más tumorigénicas que la población negativa. Las células no clasificadas crecen de modo similar a las células positivas de N-cadherina.

[0161] Tal como se muestra en las Figuras 3 y 4, los tumores del 100% de células N-cad positivas son sólo 41,25% positivas para N-cadherina, lo cual sugiere que estas células producen células de N-cadherina cero. Esto es consistente con la

hipótesis de que las células de N-cadherina positivas sean células madre que pueden producir células N-cadherina negativas más diferenciadas. Mientras tanto, la población de N-cadherina negativa produce tumores que son 9% de N-cadherina positiva, similares a las células no clasificadas. Esto sugiere que el crecimiento de estas células requiere que una población de tipo madre adquiere o regula hacia arriba la N-cadherina a fin de formar tumores independientes de andrógenos. El retraso de la tumorigenicidad es causada por el requerimiento de que la N-cadherina produzca tumores independientes de andrógenos.

[0162] Se entiende que los ejemplos y formas de realización descritas en la presente son solo con fines ilustrativos y que a la luz de estos varias modificaciones o cambios serán sugeridas a los expertos en la técnica y están dentro del alcance del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones anexas. Todas publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en la presente se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todos los fines.

REIVINDICACIONES

1. Un método de tratamiento de un paciente con cáncer, que comprende las etapas de:

(a) obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina;

(b) determinar la presencia o ausencia o la cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; diagnosticando así dicho cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos o se expresa por medio de un subgrupo de células y en donde la proteína N-cadherina no se sobreexpresa; y

(c) administrar una cantidad efectiva de anticuerpo de N-cadherina o uno de sus fragmentos al individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína de N-cadherina.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra de tejido es tejido de próstata o de vejiga.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento es un diacuerpo.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo bloquea el cáncer de próstata refractario a las hormonas.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo bloquea células madre de cáncer.

12. Un método de identificación de células madre de cáncer, que comprende las etapas de:

(a) obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en 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 ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; en donde la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos o se expresa por medio de un subgrupo de células madre y no se sobreexpresa.

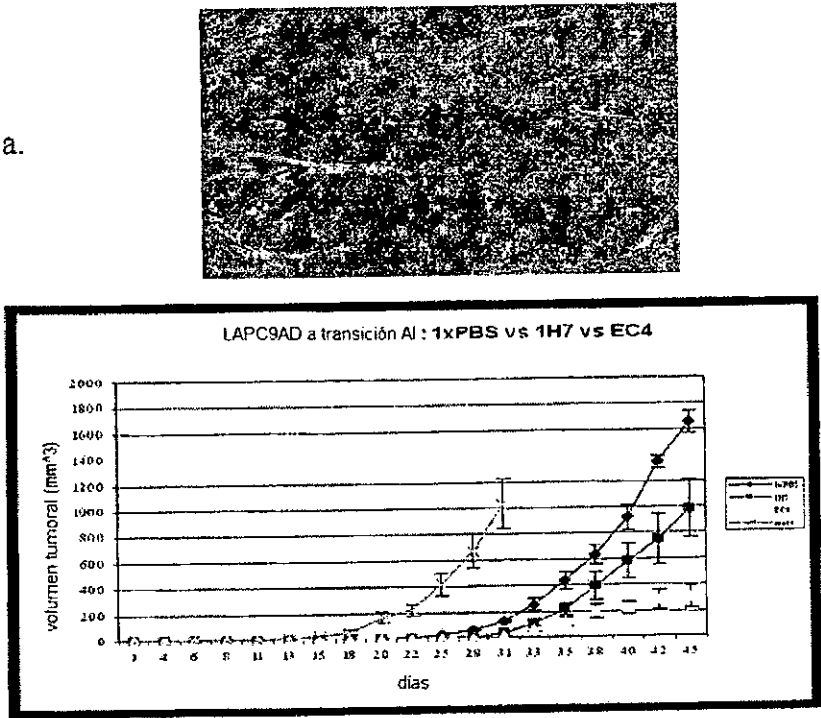


FIGURA 1

Curva de crecimiento del tumor de clas. LAPC8A1

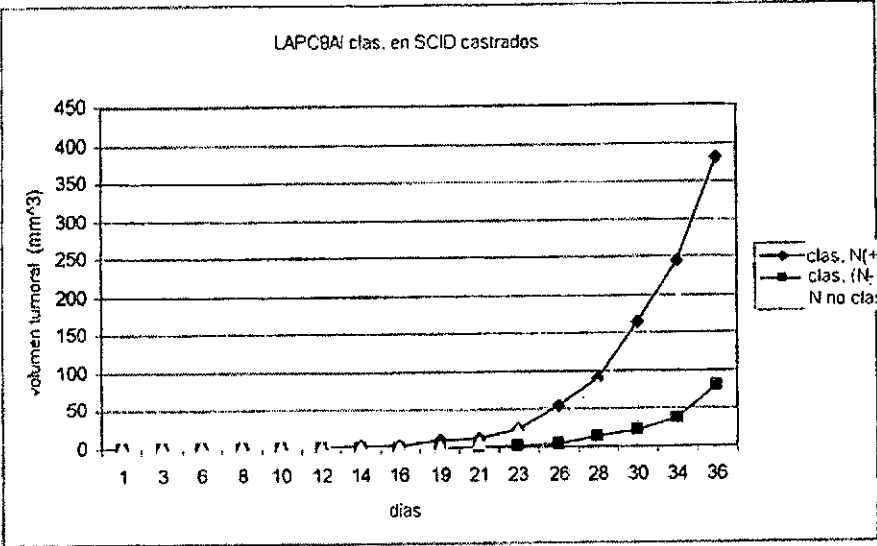


FIGURA 2

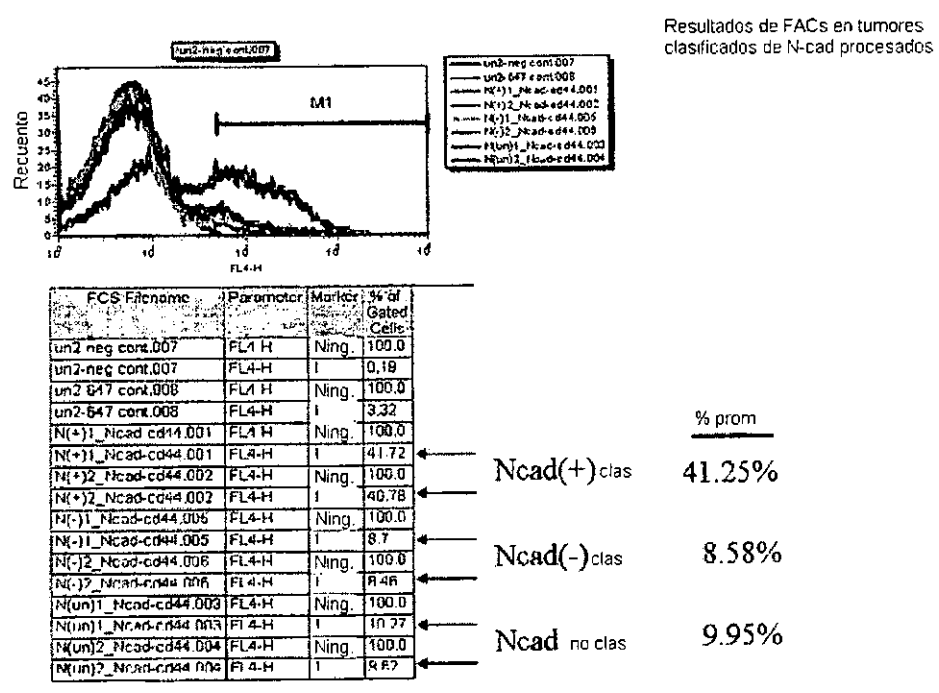


FIGURA 3

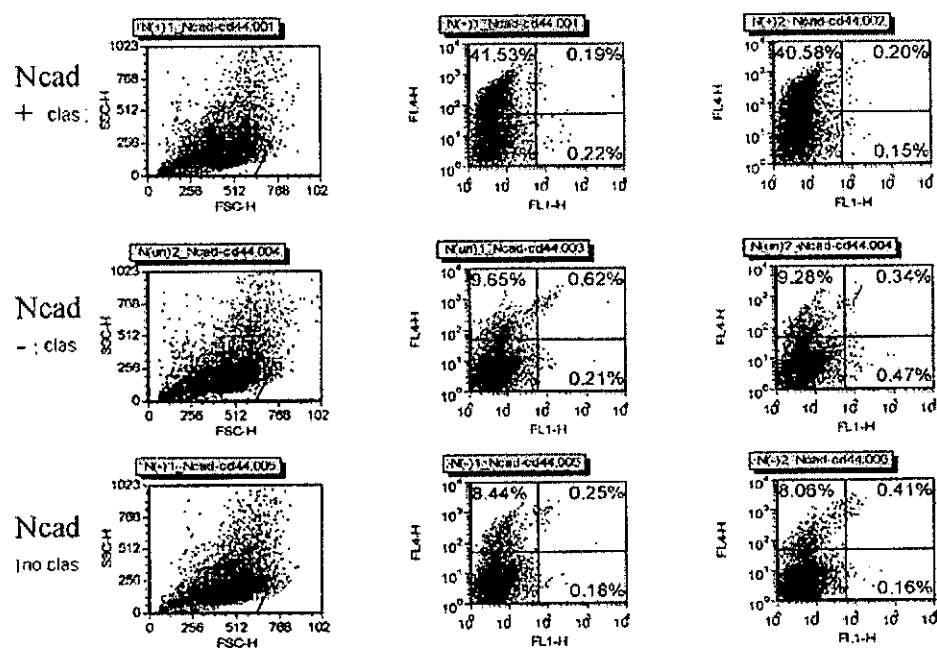


FIGURA 4

FIGURA 5

Información de secuencia de proteína N-Cadherina humana

1 mcriagalrt lpllaallqa sveasgeial cktgfpedvy savlskdvhe
gqpllnvkfs

61 ncngkrkvqy essepadfkv dedgmvyavr sfplssehak fliyaqdket
gekwqvavkl

121 slkptltees vkesaeveei vfprqfskhs ghlqrqkrdw vippinlpen
srgpfpqelv

181 rirsdrdknl slrysvtgpg adqpptgifi inplsgqlsv tkpldreqla
rfhlrahavd

241 ingnqvenpi divinvidmn dnrpeflhqv wngtvpegsk pgtyvmtvta
idaddpnaln

301 gmlryrivsq apstpspnmf tinnetgdii tvaagldrek vqgytliiqa
tdmegnptyg

361 lsntatavit vtdvndnppe ftamtfygev penrvdiiva nltvtdkdqp
htpawnavyr

421 isggdptgrf aiqtdpnsnd glvtvvkpid fetnrmfvlt vaaengvpla
kgiqhppqst

481 atvsvtvidv nenpyfapnp kiirqeeglh agtmlttfta qdpdrymqqn
irytklsdpa

541 nwlkidpvng qittiavldr espnvknniy natflasng ippmsgtgtl
 qiylldindn

601 apqvlpqeae tcetpdpnsi nitaldydid pnagpfafdl plspvtikrn
 wtitrlnngdf

661 aqlnlkikfl eagiyevpii itdsgnppks nisilrvkvc qcdsngdctd
 vdrivgaglg

721 tgaiiaillc iiillilvlm fvvwmkrrdk erqakqllid peddvrdnil
 kydeegggee

781 dqdydlsqlq qpdtvepdai kpvgirrmde rpihaepqyp vrsaaphpgd
 igdfineglk

841 aadndptapp ydsllvfdye gsgstlgsls slnssssgge qdydyln dwg
 prfkkladmy

901 gggdd

mARN

ORIGEN

1 atgtgccgga tagcgggagc gctgcggacc ctgccgctgc tggcggccct
 gcttcaggcg

61 tctgtagagg cttctggtga aatcgcata tgcaagactg gatttcctga
 agatgtttac

121 agtgcagtct tatcgaagga tgtgcatgaa ggacagcctc ttctcaatgt
gaagtttagc

181 aactgcaatg gaaaaagaaa agtacaatat gagagcagtg agcctgcaga
ttttaagggtg

241 gatgaagatg gcatggtgta tgccgtgaga agctttccac tctcttctga
gcatgccaaag

301 ttcttgatat atgccaaga caaagagacc caggaaaagt ggcaagtggc
agtaaaattg

361 agcctgaagc caaccttaac tgaggagtca gtgaaggagt cagcagaagt
tgaagaaata

421 gtgttcccaa gacaattcag taagcacagt ggccacctac aaaggcagaa
gagagactgg

481 gtcatccctc caatcaactt gccagaaaac tccaggggac cttttcctca
agagcttgtc

541 aggatcaggt ctgatagaga taaaaacctt tcaactgcggt acagtgtaac
tgggccagga

601 gctgaccagc ctccaactgg tatcttcatt atcaacccca tctcgggtca
gctgtcgggtg

661 acaaagcccc tggatcgcgga gcagatagcc cggtttcatt tgagggcaca
tgcagtagat

721 attaattggaa atcaagtgga gaacccatt gacattgtca tcaatgttat
tgacatgaat

781 gacaacagac ctgagttctt acaccagggtt tggaatggga cagttcctga
gggatcaaag

841 cctggaacat atgtgatgac cgtaacagca attgatgctg acgatcccaa
tgccctcaat

901 gggatgttga ggtacagaat cgtgtctcag gctccaagca ccccttcacc
caacatgttt

961 acaatcaaca atgagactgg tgacatcatc acagtggcag ctggacttga
tcgagaaaaa

1021 gtgcaacagt atacgttaat aattcaagct acagacatgg aaggcaatcc
cacatatggc

1081 ctttcaaaca cagccacggc cgtcatcaca gtgacagatg tcaatgacaa
tcctccagag

1141 tttactgcca tgacgtttta tggatgaagtt cctgagaaca gggtagacat
catagtagct

1201 aatctaactg tgaccgataa ggatcaaccc catacaccag cctggaacgc
agtgtacaga

1261 atcagtggcg gagatcctac tggacgggtc gccatccaga ccgacccaaa
cagcaacgac

1321 gggttagtca ccgtgggtcaa accaatcgac tttgaaacaa ataggatggt
tgtccttact

1381 gttgctgcag aaaatcaagt gccattagcc aagggaattc agcaccgcc
tcagtcaact

1441 gcaaccgtgt ctgttacagt tattgacgta aatgaaaacc cttattttgc
ccccaatcct

1501 aagatcatto gccagaaga agggcttcat gccggtacca tggtgacaac
attcactgct

1561 caggaccag atcgatatat gcagcaaat attagatata ctaaattatc
tgatcctgcc

1621 aattggctaa aaatagatcc tgtgaatgga caaataacta caattgctgt
tttggaccga

1681 gaatcaccaa atgtgaaaaa caatatatat aatgctactt tccttgcttc
tgacaatgga

1741 attcctccta tgagtggaac aggaacgctg cagatctatt tacttgatat
taatgacaat

1801 gccctcaag tgttacctca agaggcagag acttgcgaaa ctccagaccc
caattcaatt

1861 aatattacag cacttgatta tgacattgat ccaaattgctg gaccatttgc
ttttgatctt

1921 cctttatctc cagtgactat taagagaaat tggaccatca ctcggttaa
tggtgatttt

1981 gctcagctta atttaaagat aaaatttctt gaagctggta tctatgaagt
tccatcata

2041 atcacagatt cgggtaatcc tcccaaatca aatatttcca tcctgcgcgt
gaaggtttgc

2101 cagtgtgact ccaacgggga ctgcacagat gtggacagga ttgtgggtgc
ggggcttggc

2161 accggtgcca tcattgccat cctgctctgc atcatcatcc tgcttatcct
tgtgctgatg

2221 tttgtggatg ggatgaaacg gcgggataaa gaacgccagg ccaaacaact
tttaattgat

2281 ccagaagatg atgtaagaga taatatatta aaatatgatg aagaagggtg
aggagaagaa

2341 gaccaggact atgacttgag ccagctgcag cagcctgaca ctgtggagcc
tgatgccatc

2401 aagcctgtgg gaatccgacg aatggatgaa agacccatcc acgctgagcc
ccagtatccg

2461 gtccgatctg cagccccaca ccctggagac attggggact tcattaatga
gggccttaaa

2521 gcggctgaca atgacccac agctccacca tatgactccc tgttagtgtt
tgactatgaa

2581 ggcagtggct ccaccttggg gtccttgagc tcccttaatt cctcaagtag
tggtggtgag

2641 caggactatg attacctgaa cgactggggg ccacggttca agaaacttgc
tgacatgtat

2701 ggtggagggtg atgactga

traducción = "MCRIAGALRTLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDVYSAVL
 SKDVHEGQPLLNVKFSNCNGKRKVQYESSEPADFKVDEDGMVYAVRSFPLSSEHAKFL
 IYAQDKETQEKWQVAVKLSLKPTLTEESVKESAEVEEIVFPRQFSKHSGLQRQKRDW
 VIPPINLPENSRGPFPPQELVRIRSDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPTGIFIINPISGQL
 SVTKPLDREQIARFHLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEFLHQVWNGTVP
 EGSKPGTYVMTVTAIDADDPNALNGMLRYRIVSQAPSTPSPNMFTINNETGDIITVAA
 GLDREKVQQYTLIIQATDMEGNPTYGLSNTATAVITVTDVNDNPPEFTAMTFYGEVPE
 NRVDIIIVANLTVTDKQPHTPAWNNAVYRISGGDPTGRFAIQTDPNNSNDGLVTVVKPID
 FETNRMFVLTVAAENQVPLAKGIQHPPQSTATVSVTVIDVNENPYFAPNPKIIRQEEG
 LHAGTMLTTFTAQDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTI AVL DRESPNVK
 NNIYNATFLASDNGIPMSGTGTLQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETPDPNSSINITA
 LDYDIDPNAGPFAFDLPLSPVTIKRNTITRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIIT
 DSGNPPKSNISILRVKVCQCDSDNGDCTDVDRIVGAGLGTGAI IAILLCIIILLILVLM
 FVVWMKRRDKERQAKQLLIDPEDDVRDNILKYDEEGGGEEDQDYDLSQLQQPDTVEPD
 AIKPVGIRRMDERPIHAEPQYPVRSAPHPGDIGDFINEGLKAADNDPTAPPYDSLIV
 FDYEGSGSTLGSLSSLNSSSSSGGEQDYDYLNDWGPRFKKLADMYGGGDD"

Figura 6

Secuencia de variante de N-Cadherina e información de unión con anticuerpo

LOCUS NM_001792 4122 bp mRNA lineal

DEFINICIÓN cadherina 2 de Homo sapiens, tipo 1, N-cadherina (neuronal) (CDH2),

mRNA

CDS 206..2926

MCRIAGALRTLPLLAALLQASVEASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVKFSNC
NGKRKVQYESSEPADFKVDEDEGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQVAVKLSLKPT
LTEESVKESAEVEEIVFPRQFSKHSGHLQRQKRDWVIPPINLPENSRGPFQELVRIRSDRDK
NLSLRYSVTGPGADQPPTGIFIINPISGQLSVTKPLDREQIARFHLRAHAVDINGNQVENPID
IVINVIDMNDNRPEFLHQVWNGTVPEGSKPGTYVMTVTAIDADDPNALNGMLRYRIVSQAPST
PSPNMFTINNETGDIITVAAGLDREKVQQYTLLIIQATDMEGNPTYGLSNTATAVITVTDVNDN
PPEFTAMTFYGEVPENRVDIIVANLTVTDKQPHTPAWNNAVYRISGGDPTGRFAIQTDPNSSND
GLVTVVKPIDFETNRMFVLTVAAENQVPLAKGIQHPPQSTATVSVTVIDVNENPYFAPNPKII
RQEEGLHAGTMLTTFTAQDPDRYMQQNIRYTKLSDPANWLKIDPVNGQITTI AVLDRSPNVK
NNIYNATFLASDNGIPPMSGTGTLQIYLLDINDNAPQVLPQEAETCETPDPN SINITALDYDI
DPNAGPFAFDLPLSPVTIKRNWTITRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPIIITDSGNPPKSN I

SILRVKVCQCDSNGDCTDVDRIVGAGLGTGAIIAILLCIIILLILVLMFVWVMKRRDKERQAK
QLLIDPEDDVDRDNILKYDEEGGGEEDQDYDLSQLQQPDTVEPDAIKPVGIRRMDERPIHAEPQ
YPVRSAAAPHPGDIGDFINEGLKAADNDPTAPPYDSLIVFDYEGSGSTAGSLSSLNSSSSSGGEQ
DYDYLNDWGPRFKKLADMYGGGDD

Sitios de unión de anticuerpos: Ncad 1H7, 2B3, 1F12 - 21-425aa;

1 tttgtcatca gctcgctctc cattggcggg gagcggagag cagcgaagaa
gggggtgggg
61 aggggagggg aagggaaggg ggtggaaact gcctggagcc gtttctccgc
gccgctgttg
121 gtgetgccgc tgctctctcc tcctccgccg ccgccgccgc cgccgccgcc
tcctccggct
181 cttegctcgg cccctctccg cctccatgtg ccggatagcg ggagcgctgc
ggaccctgct
241 gccgctgctg gcggccctgc ttcaggcgctc tgtagaggct tctggtgaaa
tcgcattatg Ncad 1H7, 2B3, 1F12 - 266-1482
301 caagactgga tttcttgaag atgtttacag tgcagtctta tcgaaggatg
tgcattgaagg
361 acagcctctt ctcaatgtga agtttagcaa ctgcaatgga aaaagaaaag
tacaatatga

421 gagcagtgag cctgcagatt ttaaggtgga tgaagatggc atggtgtatg
 ccgtgagaag
 481 ctttccactc tcttctgagc atgccaagtt cctgatatat gcccaagaca
 aagagaccca
 541 ggaaaagtgg caagtggcag taaaattgag cctgaagcca accttaactg
 aggagtcagt
 601 gaaggagtca gcagaagttg aagaaatagt gttcccaaga caattcagta
 agcacagtgg
 661 ccacctacaa aggcagaaga gagactgggt catccctcca atcaacttgc
 cagaaaactc
 721 caggggacct tttcctcaag agcttgtcag gatcagggtct gatagagata
 aaaacctttc
 781 actgcggtac agtgtaactg ggccaggggc tgaccagcct ccaactggta
 tcttcattatMutación "g" en lugar de "a"
 841 caaccccatc tcgggtcagc tgtcggtgac aaagcccctg gatcgcgagc
 agatagcccg
 901 gtttcatttg agggcacatg cagtagatat taatggaaat caagtggaga
 accccattga
 961 cattgtcatc aatggttattg acatgaatga caacagacct gagttcttac
 accaggtttg
 1021 gaatgggaca gttcctgagg gatcaaagcc tggaacatat gtgatgaccg
 taacagcaat

1081 tgatgctgac gatcccaatg ccctcaatgg gatggtgagg tacagaatcg
tgtctcaggc

1141 tccaagcacc ccttcaccca acatgtttac aatcaacaat gagactgggtg
acatcatcac

1201 agtggcagct ggacttgatc gagaaaaagt gcaacagtat acgttaataa
ttcaagctac

1261 agacatggaa ggcaatccca catatggcct ttcaaacaca gccacggccg
tcatcacagt

1321 gacagatgtc aatgacaatc ctccagagtt tactgccatg acgttttatg
gtgaagttcc

1381 tgagaacagg gtagacatca tagtagctaa tctaactgtg accgataagg
atcaacccca

1441 tacaccagcc tggaacgcag tgtacagaat cagtggcgga gatcctactg
gacggttcgc

1501 catccagacc gacccaaaca gcaacgacgg gttagtcacc gtggtcaaac
caatcgactt

1561 tgaaacaaat aggatgtttg tccttactgt tgctgcagaa aatcaagtgc
cattagccaa

1621 gggaattcag caccgcctc agtcaactgc aaccgtgtct gttacagtta
ttgacgtaaa

1681 tgaaaaccct tattttgccc ccaatcctaa gatcattcgc caagaagaag
ggcttcatgc

1741 cggtaccatg ttgacaacat tcactgctca ggacccagat cgatatatgc
agcaaaatat

1801 tagatacact aaattatctg atcctgocaa ttggctaaaa atagatcctg
tgaatggaca

1861 aataactaca attgctgttt tggaccgaga atcaccaa atgtgaaaaaca
atatatatataa

1921 tgctactttc cttgcttctg acaatggaat tcctcctatg agtggaacag
gaacgctgca

1981 gatctattta cttgatatta atgacaatgc ccctcaagtg ttacctcaag
aggcagagac

2041 ttgcgaaact ccagacccca attcaattaa tattacagca cttgattatg
acattgatcc

2101 aaatgctgga ccatttgctt ttgatcttcc tttatctcca gtgactatta
agagaaattg

2161 gaccatcact cggcttaatg gtgattttgc tcagcttaat ttaaagataa
aattttcttga

2221 agctggtatc tatgaagttc ccatcataat cacagattcg ggtaatcctc
ccaaatcaaa

2281 tatttccatc ctgcgcgtga aggtttgcc aatgtgactcc aacgggggact
gcacagatgt

2341 ggacaggatt gtgggtgcgg ggcttggcac cggtgccatc attgccatcc
tgctctgcat

2401 catcatcctg cttatccttg tgctgatggt tgtggatatgg atgaaacgcc
gggataaaga

2461 acgccaggcc aaacaacttt taattgatcc agaagatgat gtaagagata
atatttttaa

2521 atatgatgaa gaagggtggag gagaagaaga ccaggactat gacttgagcc
agctgcagca

2581 gcctgacact gtggagcctg atgccatcaa gcctgtggga atccgacgaa
tggatgaaag

2641 acccatccac gctgagcccc agtatccggt ccgatctgca gccccacacc
ctggagacat

2701 tggggacttc attaatgagg gccttaaagc ggctgacaat gacccacag
ctccaccata

2761 tgactccctg ttagtggttg actatgaagg cagtggctcc actgctgggt
ccttgagctc

2821 ccttaattcc tcaagtagtg gtggtgagca ggactatgat tacctgaacg
actggggggc

2881 acggttcaag aaacttgctg acatgtatgg tggaggatgat gactgaactt
cagggatgaac

2941 ttggtttttg gacaagtaca aacaatttca actgatattc ccaaaaagca
ttcagaagct

3001 aggcctttaac tttgtagtct actagcacag tgcttgctgg aggcctttggc
ataggctgca

3061 aaccaatttg ggctcagagg gaatatcagt gatccatact gtttggaaaa
acactgagct

3121 cagttacact tgaattttac agtacagaag cactgggatt ttatgtgcct
ttttgtacct

3181 ttttcagatt ggaattagtt ttctgtttta ggctttaatg gtactgattt
ctgaaacgat

3241 aagtaaaaga caaaatattt tgtggtggga gcagtaagtt aaaccatgat
atgcttcaac

3301 acgcttttgt tacattgcat ttgcttttat taaaatacaa aattaaacaa
acaaaaaac

3361 tcatggagcg attttattat cttgggggat gagaccatga gattggaaaa
tgtacattac

3421 ttctagtttt agactttagt ttgttttttt tttttcacta aaatcttaaa
acttactcag

3481 ctggttgcaa ataaaggag ttttcatatc accaatttgt agcaaaattg
aattttttca

3541 taaactagaa tgttagacac attttggctt taatccatgt acactttttt
atttctgtat

3601 ttttccactt cactgtaaaa atagtatgtg tacataatgt tttattggca
tagtctatgg

3661 agaagtgcag aaacttcaga acatgtgtat gtattatttg gactatggat
tcagggtttt

3721 tgcattgttta tatcttttcgt tatggataaa gtattttacaa aacagtgaca
tttgattcaa

3781 ttgttgagct gtagttagaa tactcaattt ttaatttttt taattttttt
attttttatt

3841 ttcttttttg tttggggagg gagaaaagtt cttagcacia atgtttttaca
taattttgtac

3901 caaaaaaaaa aaaaaggaaa ggaaagaaag ggggtggcctg acactgggtg
cactactaag

3961 tgtgtgtttt ttaaaaaaaaa aaatggaaaa aaaaaagctt ttaaactgga
gagacttctg

4021 acaacagctt tgcctctgta ttgtgtacca gaatataaat gatacacctc
tgaccccagc

4081 gttctgaata aaatgctaatt ttggaaaaa aaaaaaaaaa aa

Observar la mutación en 808. Cuando se somete a secuenciación,
es "g" en lugar de "a" tal como se publica,

códigos para el mismo aa. Los aminoácidos se resaltan en el
adjunto.

FOM

PCT/US2009/063921

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: PARENT ANNETTE S. TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP TWO EMBARCADERO CENTER, EIGHTH FLOOR SAN FRANCISCO CA 94111-3834 USA		PCT	
<i>02307K-167830PC</i>		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION (PCT Rule 44.1)	
		Date of mailing (day/month/year) 28 JUNE 2010 (28.06.2010)	
Applicant's or agent's file reference 2307K-1678-3		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/US2009/063921 ✓		International filing date (day/month/year) 10 NOVEMBER 2009 (10.11.2009) ✓	
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al ✓			

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
- Filing of amendments and statement under Article 19:**
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46): *8-28-10*
When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.
Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70
 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to any protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

5-10-10
 Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

10-10-10
 Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

5-10-11 *7-10-10*
 In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, National Chapters.

Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140 Form PCT/ISA/220 (July 2009)	Authorized officer ☒ Docketed ☐ Undocketed Commissioner Not Docketed Telephone No. 82-42-481-5209	
---	--	---

Article 19.3 File IDS
8-28-10
9-28-10
9-28-10
 Townsend and Townsend and Crew LLP

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*.

In these Notes, "Article", "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annex B).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet or sheets containing a complete set of claims in replacement of all the claims previously filed must be submitted.

Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively in Arabic numerals (Section 205(a)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1 - 10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion 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 (Rule 43bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, National Chapters.

* Attention

Copies of the documents cited in the international search report can be searched in the following Korean Intellectual Property Office English website for three months from the date of mailing of the international search report.

<http://www.kipo.go.kr/en/> => Patent Search => PCT-Service

ID : PCT international application number
PW : 0Y4KDL8S

Inquiries related to PCT International Search Report or Written Opinion prepared by KIPO as an International Searching Authority can be answered not only by KIPO but also through IPKC (Intellectual Property Korea Center), located in Vienna, VA, which functions as a PCT Help Desk for PCT applicants.

Homepage: <http://www.ipkcenter.com>
Email: ipkc@ipkcenter.com
Phone: +1 703 388 1066
Fax: +1 703 388 1084

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: PARENT ANNETTE S. TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP TWO EMBARCADERO CENTER, EIGHTH FLOOR SAN FRANCISCO CA 94111-3834 ESTADOS UNIDOS	PCT NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Y DE LA OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA DECLARACIÓN (Norma 44.1 del PCT) Fecha de remisión (día/mes/año) 28 de junio de 2010 (28-06- 2010)
Referencia de archivo del Solicitante o Agente 2307K-1678-3	PARA OTROS TRAMITES Véanse los párrafo 1 y 4 a continuación
Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2009/063923	Fecha de presentación internacional (día/mes/año): 10 de noviembre de 2009 (10- 11-2009)
Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y otros	
1. [x] Por la presente se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se han establecido y se transmiten con la presente: Presentación de modificaciones y testimonio conforme a la Cláusula 19. El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar las reivindicaciones de la solicitud de patente	

internacional (véase la Norma 46):

¿Cuándo? El plazo para presentar dichas modificaciones es normalmente de 2 meses desde la fecha de transmisión del Informe de Búsqueda Internacional.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin de Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)338-8270

Para obtener instrucciones más detalladas, véanse las notas en la página adjunta.

2. [] Por la presente se notifica al solicitante que no se establecerá informe de búsqueda internacional y que la declaración conforme al Artículo 17(2)(a) a tal efecto y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se transmiten con la presente.

3. [] Con respecto la protesta contra el pago de (un) arancel(es) adicionales conforme a la Norma 40.2, se notifica al solicitante que:

[] la protesta así como la resolución sobre ella ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con el pedido del solicitante de remitir los textos de la protesta y de la resolución sobre ella a las Oficinas designadas.

[] aún no ha habido resolución sobre la protesta; el solicitante será notificado en cuanto haya una resolución.

4. Recordatorios:

Poco después de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional publicará la solicitud de patente internacional. Si el solicitante desea impedir o postergar la publicación, un escrito de retiro de la solicitud de patente internacional, o de la reivindicación de prioridad, deberán ser presentados ante la Oficina Internacional según lo previsto en las Normas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de la finalización de los preparativos técnicos para la publicación internacional.

El solicitante podrá presentar ante la Oficina Internacional observaciones en forma informal acerca de la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional. La Oficina Internacional remitirá una copia de esas observaciones a todas las oficinas designadas a menos que se haya establecido o se deba establecer un informe del examen preliminar internacional. Estas observaciones también estarían disponibles para el público pero no con anterioridad al vencimiento del plazo de 30 meses des de la fecha de

prioridad.

Dentro de los **19 meses** desde la fecha de prioridad, deberá presentarse un pedido de examen preliminar internacional si el solicitante desea postergar el ingreso en la fase nacional hasta los 30 meses desde la fecha de prioridad (en algunas Oficinas más); de lo contrario el solicitante deberá, dentro de los 20 meses, realizar los trámites previstos para el ingreso en la fase nacional ante aquellas Oficinas designadas.

Con respecto a las demás Oficinas designadas, el plazo de 30 meses (o con posterioridad) será aplicable aún cuando no se presente ningún pedido dentro de los 19 meses.

Véase el Anexo al Formulario PCT/IB/301 y, para detalles acerca de los plazos aplicables, Oficina por Oficina, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen II, Sedes Nacionales y el sitio de Internet de la WIPO.

Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/KR	Funcionario Autorizado:
Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea	COMISARIO
Complejo Gubernamental-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, República de Corea	Nº Telefónico: 82-42-481-5209
Nº de Fax 82-42-472-7140	

NOTAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas Notas están destinadas a dar las instrucciones básicas para la presentación de enmiendas conforme a la Cláusula 19. Las Notas están basadas en los requisitos del Tratado de Cooperación sobre Patentes, las Reglamentaciones e Instrucciones Administrativas conforme a ese Tratado. En caso de discrepancia entre estas Notas y aquellos requisitos, se aplicarán los últimos. Para obtener información más precisa, véase también la *Guía del Solicitante de PCT*.

En estas Notas, "Cláusula", "Norma", y "Artículo" se refieren a las disposiciones del PCT, las Reglamentaciones del PCT y las Instrucciones Administrativas, respectivamente.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A ENMIENDAS CONFORME A LA CLÁUSULA**19**

El solicitante tiene, con posterioridad a la recepción del informe de búsqueda internacional, una oportunidad de enmendar las reivindicaciones de la solicitud de patente internacional. Sin embargo, se debe enfatizar que, dado que todas las partes de la solicitud de patente internacional (reivindicaciones, memoria descriptiva y dibujos), pueden ser enmendados durante el procedimiento de examen preliminar internacional, habitualmente no hay necesidad de presentar enmiendas a las reivindicaciones conforme a la Cláusula 19 salvo cuando, por

ejemplo, el solicitante desea que estas últimas se publiquen para los propósitos de protección provisional o tiene otra razón para enmendar las reivindicaciones con anterioridad a la publicación internacional. Asimismo, debe enfatizarse que la protección provisional está disponible solamente en algunos Estados (véase la *Guía del Solicitante de PCT*, Anexo B).

Se llama la atención del solicitante hacia el hecho de que no se admiten enmiendas a las reivindicaciones conforme a la Cláusula 19 cuando la Autoridad de Búsqueda Internacional ha declarado, conforme a la Cláusula 17(2), que no establecerá ningún informe de búsqueda internacional (véase la *Guía del Solicitante de PCT*, párrafo 296).

¿Qué partes de la solicitud de patente internacional pueden enmendarse?

Conforme a la Cláusula 19, se pueden enmendar solamente las reivindicaciones.

Durante la fase internacional, las reivindicaciones también pueden enmendarse (o enmendarse nuevamente) conforme a la Cláusula 34 ante la Autoridad del Examen Preliminar Internacional. La memoria descriptiva y los dibujos podrán enmendarse solamente conforme a la Cláusula 34 ante la Autoridad del Examen preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, todas las partes de la solicitud de patente internacional podrán enmendarse conforme a la Cláusula 28 o, cuando corresponda, la Cláusula 41.

¿Cuándo?

Dentro de los 2 meses desde la fecha de envío del informe de búsqueda internacional o de los 16 meses desde la fecha de prioridad, el plazo que venza más tarde. Debe hacerse notar, sin embargo, que las enmiendas se considerarán como recibidas en fecha si son recibidas por la Oficina Internacional con posterioridad a la fecha de vencimiento del plazo aplicable pero con anterioridad a las preparaciones técnicas para la publicación internacional (Norma 46.1)

¿Dónde no deben presentarse enmiendas?

Las enmiendas pueden presentarse solamente ante la Oficina Internacional y no ante la Oficina receptora o la Autoridad de Búsqueda Internacional (Norma 46.2)

Cuando se presente / se haya presentado un pedido de examen preliminar internacional, ver abajo.

¿Cómo?

Cancelando una o más reivindicaciones completas, agregando una o más reivindicaciones o enmendando el texto de una o más de las reivindicaciones presentadas.

Deberá presentarse una página o páginas de reemplazo que contenga un pliego de reivindicaciones completo en reemplazo de todas las reivindicaciones presentadas previamente.

Cuando se cancele una reivindicación, no se requiere que se numeren nuevamente las demás reivindicaciones. En todos los casos en que se numeren nuevamente reivindicaciones, éstas deberán ser numeradas nuevamente en forma consecutiva, en números arábigos. (Artículo 205(b))

Las enmiendas deberán realizarse en el idioma en el cual se debe publicar la solicitud de patente internacional.

¿Qué documentos deben/pueden adjuntarse a las enmiendas?

Carta (Artículo 205(b)):

Las enmiendas deberán presentarse con una carta.

La carta no será publicada con la solicitud de patente internacional y las reivindicaciones enmendadas. No deberá confundirse con la "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)" (ver abajo, en "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)").

La carta deberá estar en inglés o francés, a elección del solicitante. Sin embargo, si el idioma de la solicitud de patente internacional es el inglés, la carta deberá estar en inglés; si el idioma de la solicitud de patente internacional es el francés, la carta deberá estar en francés.

NOTAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220 (continuación)

La carta deberá indicar las diferencias entre las reivindicaciones presentadas y las reivindicaciones enmendadas. Deberá, en particular, indicar, en relación con cada reivindicación que aparece en la solicitud de patente internacional (entendiéndose que las indicaciones idénticas referidas a varias reivindicaciones pueden agruparse), si

- (i) la reivindicación no cambia;
- (ii) la reivindicación se cancela;
- (iii) la reivindicación es nueva;
- (iv) la reivindicación reemplaza a una o más reivindicaciones presentadas;
- (v) la reivindicación es el resultado de la división de una reivindicación presentada

Los siguientes ejemplos ilustran la forma en que deben explicarse las enmiendas en la carta que se acompaña:

1. [Cuando originalmente había 48 reivindicaciones y después de la enmienda de algunas reivindicaciones hay 51]:

"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 reemplazadas por las reivindicaciones enmendadas que llevan los mismos números; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin cambios; se agregan las nuevas reivindicaciones 49 a 51".

2. [Cuando originalmente había 15 reivindicaciones y después de la enmienda de todas las reivindicaciones hay 11]:

"Las reivindicaciones 1 a 11 reemplazadas por las reivindicaciones enmendadas 1 a 11".

3. [Cuando originalmente había 14 reivindicaciones y las enmiendas consisten en cancelar algunas reivindicaciones y agregar nuevas reivindicaciones]:

"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 quedan sin cambios; las reivindicaciones 7 a 13 se cancelan; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17" o

"Las reivindicaciones 7 a 13 se cancelan; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin cambios".

4. [Cuando se realizan diversos tipos de enmiendas]:

"Las reivindicaciones 1-10 quedan sin cambios; se cancelan las reivindicaciones 11 a 13, 18 y 19; las reivindicaciones 14, 15 y 16 son reemplazadas por la reivindicación 14; la reivindicación 17 se subdivide en las reivindicaciones enmendadas 15, 16 y 17; se agregan nuevas reivindicaciones 20 y 21".

"Declaración conforme a la Cláusula 19(1)" (Norma 46.4)

Las enmiendas pueden estar acompañadas por una declaración donde se explican las enmiendas y se indica cualquier impacto que tales enmiendas podrían tener en la memoria descriptiva y los dibujos (que no pueden ser enmendados conforme a la Cláusula 19(1)).

La declaración se publicará con la solicitud de patente internacional y las reivindicaciones enmendadas.

Deberá estar en el idioma en el cual se ha de publicar la solicitud de patente internacional.

Deberá ser breve, no excediendo las 500 palabras si está en inglés o se traduce al inglés.

No deberá confundirse con y no reemplaza a la carta donde se indican las diferencias entre las reivindicaciones presentadas y las enmendadas. Deberá ser presentada en hoja aparte y deberá ser identificada como tal con un encabezamiento, preferentemente usando las palabras "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)".

No podrá contener ningún comentario que desacrediten el informe de búsqueda internacional o la relevancia de las citas contenidas en ese informe. La referencia a citas, relevantes para una reivindicación, contenidas en el informe de búsqueda internacional puede efectuarse solamente en relación con una enmienda de esa reivindicación.

Consecuencia si ya se ha presentado un pedido de examen preliminar internacional

Si, a la fecha de presentar enmiendas y declaraciones adjuntas, conforme a la Cláusula 19, ya se ha presentado un pedido de examen preliminar internacional, el solicitante deberá preferentemente, en el momento de la presentación de las enmiendas (y toda declaración) ante la Oficina

Internacional, presentar también ante la Autoridad del Examen Preliminar Internacional una copia de esas enmiendas (y de las declaraciones adjuntas) y, cuando se requiera, una traducción de esas declaraciones para el procedimiento ante esa Autoridad (ver las Normas 55.3(a) y 62.2, inciso primero). Para más información, ver las Notas al formulario de pedido (PCT/IPEA/401).

Consecuencia con respecto a la traducción de la solicitud de patente internacional para el ingreso en la fase nacional

Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que, al ingresar en la fase nacional, puede tener que presentar una traducción de las reivindicaciones enmendadas conforme a la Cláusula 19 ante las Oficinas designadas/elegidas, en lugar de, o además de, la traducción de las reivindicaciones presentadas.

Para obtener más detalles sobre los requisitos de cada Oficina designada/elegida, ver Volumen II de la Guía del Solicitante de PCT.

*Atención:

Las copias de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional se podrán buscar en el siguiente sitio web en inglés de la Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea durante tres meses desde la fecha de remisión del informe de búsqueda internacional.

<http://www.kipo.gov.kr/en/> → Patent Search → PCT-Service

ID: número de publicación de la solicitud de patente internacional PCT

Contraseña (PW): OY4KDL8S

Las preguntas relacionadas con el Informe de Búsqueda Internacional PCT o la Opinión Escrita preparada por la Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea (KIPO) como Autoridad de Búsqueda Internacional podrán ser respondidas no solamente por la KIPO sino también a través del IPKC (Centro Corea de la Propiedad Intelectual), sito en Vienna, VA, que funciona como Escritorio de Ayuda de PCT para solicitantes de PCT.

Página principal: <http://www.ipkcenter.com>

Correo electrónico: ipkc@ipkcenter.com

Número telefónico: +1 703 388 1066

Fax: +1 703 388 1084

Notas al Formulario PCT/ISA/220 (página tres) (julio de 2009)

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Cláusula 18 y Normas 43 y 44 del PCT)

Referencia de Archivo del Solicitante o agente: 2307K- 1678-3	PARA REALIZAR Véase el Formulario OTROS PCT/ISA/220 y, cuando TRAMITES corresponda, del punto 5 a continuación.	
Solicitud de Patente Internacional N°: PCT/US2009/063921	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año): 10 de noviembre de 2009 (10-11-2009)	Fecha de Prioridad (Más antigua) (día/mes/año): 10 de noviembre de 2008 (10-11-2008)
Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y otros		
Este informe de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante conforme a la Cláusula 18. Se transmite una copia del mismo a la Oficina Internacional. Este informe de búsqueda internacional consta de <u>4</u> páginas. [] Está acompañado asimismo de una copia de cada documento de		

arte previo citado en el informe

1. Fundamento de Informe

a. Con respecto al **idioma**, la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en:

☒ la solicitud de patente internacional en el idioma en que ésta se presentó.

☐ una traducción de la solicitud de patente internacional al _____, que es el idioma de la traducción provista para los fines de la búsqueda internacional (Normas 12.3(a) y 23.1(b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional se ha establecido teniendo en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizada o notificada a esta Autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43.6bis(a)).

c. ☐ Con respecto a cualquier **secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos** revelada en la solicitud de patente internacional, véase el Casillero N° I

2. ☐ **Ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables** (Véase Casillero N° II)

3. ☒ **Falta Unidad de Invención** (Véase Casillero N° III).

4. Con respecto al **título**:

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante

☐ el texto ha sido establecido por esta Autoridad como sigue:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2307K-1678-3	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2009/063921	International filing date (<i>day/month/year</i>) 10 NOVEMBER 2009 (10.11.2009)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 10 NOVEMBER 2008 (10.11.2008)
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out 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))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 3

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/063921

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.: 1-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-11 pertain to methods for treatment of the human body by therapy/diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulation under the PCT, to search.
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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/063921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 13/08(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/395; C12N 5/08; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility modelsElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: n-cadherin, cancer stem cell, prostate cancer, bladder cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 September 2007 See abstract, paragraphs [0009],[0010], claims 1,5-9	12-17
Y	US 2007-0105133 A1 (CIARKE, MICHAEL F. et al) 10 May 2007 See abstract, paragraphs [0018], claims 1-7	12-17
A	US 2004-0248219 A1 (BLASCHUK, OREST W. et al.) 09 December 2004 See paragraphs [0006]-[0009],[0024],[0071],[0080], claims 44,46,47,49,62	12-17
A	TOMITA, KYOICHI et al., "Cadherin Switching in Human Prostate Cancer Progression", Cancer Research, 1 July 2000, Vol.60, pages 3650-3654 See abstract, pages 3652, 3653	12-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* 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 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

28 JUNE 2010 (28.06.2010)

Date of mailing of the international search report

28 JUNE 2010 (28.06.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-
gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Jung Da Won

Telephone No. 82-42-481-8147



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2009/063921

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-109347 A2	27.09.2007	AU 2007-227195 A1 CA 2646597-A1 EP 2004230 A2 EP 2004230 A4 JP 2009-530645 T US 2009-130108 A1 WO 2007-109347 A2 WO 2007-109347 A3	27.09.2007 27.09.2007 24.12.2008 20.05.2009 27.08.2009 21.05.2009 27.09.2007 16.10.2008
US 2007-0105133 A1	10.05.2007	None	
US 2004-0248219 A1	09.12.2004	AU 1999-35906 A1 AU 1999-35906 B2 AU 1999-35907 B2 AU 2001-272717 B2 AU 2001-72717 A1 CA 2327530-A1 CA 2404202-A1 EP 1075494 A2 EP 1366076 A2 EP 1970383 A1 JP 2002-513804 A JP 2004-504809 A US 2002-0123044 A1 US 2002-0146687 A1 US 2002-0169106 A1 US 2003-0082166 A1 US 2003-0096746 A1 US 2003-0229199 A1 US 2004-0229811 A1 US 6358920 B1 US 6433149 B1 US 6472367 B1 US 6569996 B1 US 6593297 B2 US 6638911 B1 US 6680175 B2 US 6682901 B2 US 6962969 B2 US 7481999 B2 US 7554190 B2 US 7663227 B2 WO 01-72956 A3 WO 2008-073707 A2 WO 2009-100374 A1 WO 99-57149 A2 WO 99-57565 A3	23.11.1999 08.08.2002 03.04.2003 18.08.2005 08.10.2001 11.11.1999 04.10.2001 14.02.2001 03.12.2003 17.09.2008 14.05.2002 19.02.2004 05.09.2002 10.10.2002 14.11.2002 01.05.2003 22.05.2003 11.12.2003 18.11.2004 19.03.2002 13.08.2002 29.10.2002 27.05.2003 15.07.2003 28.10.2003 20.01.2004 27.01.2004 08.11.2005 27.01.2009 30.06.2009 16.02.2010 04.10.2001 19.06.2008 13.08.2009 11.11.1999 11.11.1999

5. Con respecto al **resumen**:

☒ el texto es aprobado como lo presentó el solicitante

☐ el texto ha sido establecido, conforme a la Norma 38.2(b), por esta Autoridad como aparece en el Casillero N° IV. El Solicitante puede, dentro de un mes desde la fecha de remisión de este informe de búsqueda internacional, presentar comentarios ante esta Autoridad.

6. Con respecto a los dibujos,

a. La Lámina de **dibujos** que se publicará con el resumen es:

Figura No. 3.

☒ sugerida por el Solicitante

☐ seleccionada por esta Autoridad, debido a que el Solicitante no sugirió una Figura.

☐ seleccionada por esta Autoridad, debido a que ésta es la figura que mejor caracteriza a la invención

b. ☐ No se debe publicar ninguna de las figuras con el resumen.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2009/063921
Casillero N° II. Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Continuación del punto 2 de la página 1).	
El presente informe de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones conforme a la Cláusula 17(2)(a) por los siguientes motivos: 1. ☒ Reivindicaciones N°: 1-11 porque se relacionan con un objeto que no se requiere que busque esta Autoridad, a saber: Las reivindicaciones 1-11 se refieren a métodos para el tratamiento del cuerpo humano mediante métodos de terapia/diagnóstico y por lo tanto se relacionan con un objeto que esta Autoridad de Búsqueda Internacional no necesita buscar, conforme a la Cláusula 17(2)(a)(k) del PCT y la Norma 39.1(kv) de la Reglamentación conforme al PCT. 2. ☐ Reivindicaciones N°: porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos en tal magnitud que no se puede realizar una búsqueda significativa, específicamente:	

3. ☐ Reivindicaciones N°:

porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con la segunda y tercera oraciones de la Norma 6.4(a).

Casillero N° III. Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la página 1)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varias invenciones en esta solicitud de patente internacional, a saber:

Véase la página adicional

1. ☐ Como todos los aranceles de búsqueda adicionales se pagaron oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones buscables.

2. ☐ Como las reivindicaciones buscables pudieron buscarse sin esfuerzo que justifique un arancel adicional, esta Autoridad no intima al pago de ningún arancel adicional.

3. ☐ Como ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales requeridos se pagaron oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca solamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron aranceles, específicamente las reivindicaciones N°:

4. ☐ El solicitante no pagó ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales. En consecuencia, este informe de

búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; está abarcada por las reivindicaciones N°:

Observación Bajo Protesta:

[] Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante y cuando correspondía por el arancel de protesta

[] Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante pero el arancel de protesta aplicable no se pagó dentro del plazo especificado en la invención.

[] Ninguna protesta acompañó el pago de los aranceles de búsqueda adicionales.

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la página 1 (2)) (julio de 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL

Solicitud de Patente Internacional N°
PCT/US2009/063921

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO:

**A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P
13/08(2006.01)i**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o con la clasificación nacional e IPC.

B. CAMPOS DE BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido

por símbolos de clasificación)		
A61K 39/395; C12N 5/08; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/574		
Documentación buscada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos están incluidos en los campos de búsqueda:		
Modelos de utilidad y solicitudes de modelos de utilidad coreanos		
Modelos de utilidad y solicitudes de modelos de utilidad japoneses		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda usados):		
eKOMPASS(KIPO interna) y palabras clave: n-cadherina, célula madre cancerosa, cáncer de próstata, cáncer de vejiga		
C. Documentos Considerados Relevantes		
Categoría*	Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
Y	W0 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 de septiembre de 2007. Véase el resumen, párrafos [0009],[0010], reivindicaciones 1, 5-9	12-17

Y	US 2007-0105133 A1 (CLARKE, MICHAEL F. et al) 10 de mayo de 2007. Véase el resumen, párrafo [0018], reivindicaciones 1-7	12-17
A	US 2004-0248219 A1 (BLASCHUK, OREST W. et al.) 9 de diciembre de 2004. Véanse los párrafos [0006]-[0009], [0024], [0071], [0080], reivindicaciones 44, 46, 47, 49, 62	12-17
A	TOMITA, KYOICHI et al., "Conmutación de Cadherina en el ion de Progreso de Cáncer de Próstata Humano", Investigación en Cáncer, 1 de julio de 2000, Vol. 60, páginas 3650-3654. Véase el resumen, páginas 3652, 3653	12-17
[] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C.		
[x] Véase el anexo de familia de patentes		
* Categorías especiales de "T": documento posterior		

documentos citados: publicado con posterioridad a

"A": documento que define el la fecha de presentación estado general del arte que no internacional o a la fecha de se considera de particular prioridad y que no está en relevancia conflicto con la solicitud

"E": documento anterior pero pero citado para comprender un publicado en la fecha de principio o teoría que presentación internacional o sustenta la invención.

con posterioridad a ella. "X": documento de particular

"L": documento que puede relevancia: la invención arrojar dudas sobre la reivindicada no puede reivindicación de prioridad o considerarse nueva o no puede que se cita para establecer la considerarse que implica un fecha de publicación de otra paso inventivo cuando el cita o por otra razón especial documento se toma solo.

(especificada). "Y": documento de particular

"O": documento que refiere a relevancia: la invención una revelación oral, uso, reivindicada no puede exhibición u otro medio. considerarse que implica un

"P": documento publicado antes paso inventivo cuando el de la fecha de presentación documento se combina con otro internacional pero con u otros documentos, siendo posterioridad a la fecha de dicha combinación obvia para prioridad reivindicada. un experto en el arte.

"&": documento miembro de la misma familia de patentes.	
Fecha de la finalización efectiva de la búsqueda internacional	Fecha de envío del informe de búsqueda internacional
28 de junio de 2010 (28-06- 2010)	28 de junio de 2010 (28-06- 2010)
Nombre y domicilio para Funcionario Autorizado: correspondencia de la ISA/KR Yung Da Won Oficina de la Propiedad N° Telefónico: 82-42-481-8147 Intelectual de Corea Complejo Gubernamental- Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo- gu, Daejeon 302-701, República de Corea N° de Fax 82-42-472-7140	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información sobre miembros de familia de patentes		Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2009/063921	
Documento	de Fecha	de Miembro(s)	de Fecha
patente	citado	publicación	de publicación
en el informe de		patentes	
búsqueda			
WO 2007-108247 A2	27-09-2007	AU 2007-227195 A1	27.09.2007
		CA 2646597-A1	27.09.2007
		EP 2004230 A2	24.12.2008
		EP 2004230 A4	20.05.2009
		JP 2009-530645 T	27.08.2009
		US 2009-130108 A1	21.05.2009
		WO 2007-109347 A2	27.09.2007
		WO 2007-109347 A3	16.10.2008
US2007-0105133 A1	10-05-2007	NINGUNA	

US 2004-024819 A1	9-12-2004	AU 1999-35906 A1	23.11.1999
		AU 1999-35906 B2	08.08.2002
		AU 1999-35907 B2	03.04.2003
		AU 2001-272717 B2	18.08.2005
		AU 2001-72717 A1	08.10.2001
		CA 2327530-A1	11.11.1999
		CA 2404202-A1	04.10.2001
		EP 1075494 A2	14.02.2001
		EP 1366076 A2	03.12.2003
		EP 1970383 A1	17.09.2008
		JP 2002-513804 A	14.05.2002
		JP 2004-504809 A	19.02.2004
		US 2002-0123044 A1	05.09.2002
		US 2002-0146687 A1	10.10.2002
		US 2002-0169106 A1	14.11.2002
		US 2003-0082166 A1	01.05.2003
		US 2003-0096746 A1	22.05.2003
		US 2003-0229199 A1	11.12.2003
		US 2004-0229811 A1	18.11.2004
		US 6358920 B1	19.03.2002
		US 6433149 B1	13.08.2002
		US 6472367 B1	29.10.2002
		US 6569996 B1	27.05.2003
		US 6593297 B2	15.07.2003
		US 6638911 B1	28.10.2003
		US 6680175 B2	20.01.2004
		US 6682901 B2	27.01.2004
		US 6962969 B2	08.11.2005
		US 7481999 B2	27.01.2009
		US 7554190 B2	30.06.2009
		US 7663227 B2	16.02.2010
		WO 01-72956 A3	04.10.2001
		WO 2008-073707 A2	19.06.2008
		WO 2009-100374 A1	13.08.2009
		WO 99-57149 A2	11.11.1999
		WO 99-57565 A3	11.11.1999

Formulario PCT/ISA/210 (anexo de familia de patentes) (julio de 2009)

Form

PCT/US2009/063921

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

To:
PARENT ANNETTE S.

TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP TWO
EMBARCADERO CENTER, EIGHTH FLOOR SAN
FRANCISCO CA 94111-3834 USA

Date of mailing
(day/month/year) 28 JUNE 2010 (28.06.2010)

Applicant's or agent's file reference
2307K-1678-3 02307K-167830PC

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No. PCT/US2009/063921 ✓	International filing date (day/month/year) 10 NOVEMBER 2009 (10.11.2009) ✓	Priority date (day/month/year) 10 NOVEMBER 2008 (10.11.2008) ✓
--	---	---

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K 39/395(2006.01)I, A61P 35/00(2006.01)I, A61P 13/08(2006.01)I

Applicant
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al ✓

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. 9-10-10 ✓ Undocketed 9-28-10
3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Response to Written Opinion (optional)
9-28-10

 Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302 -701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Date of completion of this opinion 28 JUNE 2010 (28.06.2010)	Signature Jung Da Won Telephone No. 82-42-481-8147
		

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2009/063921

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. a sequence listing filed or furnished
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. time of filing or 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 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/US2009/063921

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-11

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-11

relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

The subject-matter of claims 1-11 does not require an opinion with respect to industrial applicability as it is directed to a method for treatment of the human by therapy (Rule 43bis.1(b); Rule 67.1(iv) PCT).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-11

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2009/063921

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims	12-17	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	12-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	12-17	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations :

Reference is made to the following documents:

D1: WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 September 2007
D2: US 2007-0105133 A1 (CLARKE, MICHAEL F. et al) 10 May 2007
D3: US 2004-0248219 A1 (BLASCHUK, OREST W. et al.) 09 December 2004
D4: TOMITA, KYOICHI et al. Cancer Research. 1 July 2000, Vol.60, pages 3650-3654.

1. Novelty and Inventive Step

1.1 Claim 12

D1, which is considered to be the closest prior art to the subject matter of claim 12, discloses a method of diagnosing a urogenical cancer that over expresses a N-cadherin protein, the method comprising the steps of: (a) obtaining a test tissue sample from an individual at risk of having a cancer that expresses a N-cadherin protein; (b) determining the presence or absence or amount of the N-cadherin protein in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to be negative for the cancer. (see abstract, paragraphs [0009],[0010], claims 1, 5-9 of D1.)

Claim 12 differs from D1 in describing the method of using a tissue sample such as serum or blood, not the cancer stem cells. However, a method of detecting solid tumor stem cells is well-known as well as novel stem cell cancer markers in D2. (see abstract, paragraphs [0018], claims 1-7 of D2). Accordingly, claim 12 would have been obvious over D1 in view of D2. Therefore, claim 12 lacks an inventive step under PCT Article 33(3).

1.2 Concerning Claims 13-17

The additional features of claims 13-17 depending on claim 12 are identical to the feature of the tissue sample such as prostate or bladder tissue, and the kinds of cancer such as prostate cancer, bladder cancer, a hormone refractory prostate cancer and a metastatic cancer in D1. Therefore, claims 13-17 lack an inventive step under PCT Article 33(3).

2. Industrial Applicability

Claims 12-17 are industrially applicable under PCT Article 33(4).

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la

AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: PARENT ANNETTE S. TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP TWO EMBARCADERO CENTER, EIGHTH FLOOR SAN FRANCISCO CA 94111-3834 Estados Unidos		PCT OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (Norma 43bis.1 del PCT) Fecha de remisión (día/mes/año) 28 de junio de 2010 (28-06- 2010)	
Referencia de archivo del Solicitante o Agente 2307K-1678-3		PARA OTROS TRAMITES ver párrafo 2 más abajo	
Solicitud Internacional No. PCT/US2009/063921	Fecha de Presentación internacional (día, mes, año) 10 de noviembre de 2009 (10-11-2009)	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10 de noviembre de 2008 (10-11-2008)	
Clasificación Internacional de Patente (IPC) o tanto clasificación nacional como IPC A61K 39/39S(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 13/08(2006.01)i Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y otros			

1. Esta opinión escrita contiene indicaciones relacionadas con los siguientes puntos:

☒ Casillero N° I. Fundamento del informe

☐ Casillero N° II. Prioridad

☒ Casillero N° III. No establecimiento de opinión sobre la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

☐ Casillero N° IV. Falta de unidad de invención

☒ Casillero N° V. Declaración fundamentada conforme a la Cláusula 35(2) sobre la novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que fundamentan dicha declaración.

☐ Casillero N° VI. Ciertos documentos citados

☐ Casillero N° VII. Ciertos defectos en la solicitud de patente internacional

☐ Casillero N° VIII. Ciertas Observaciones sobre la solicitud de patente internacional

2. OTRAS MEDIDAS

Si se presenta un pedido de informe preliminar internacional, esta opinión se considerará como la opinión escrita de la Autoridad de Examen de Búsqueda Internacional ("IPEA") excepto que ésta no corresponda cuando el solicitante elige una Autoridad diferente de ésta para que sea la IPEA y la IPEA elegida ha notificado a la Oficina Internacional conforme a la Norma 66.1bis(b) que la opinión escrita de esta Autoridad de

Búsqueda Internacional no se considerará así.

Si esta opinión, proporcionada anteriormente, se considera la opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una contestación escrita junto con, cuando corresponda, enmiendas, con anterioridad al vencimiento de tres meses desde la fecha de la remisión del Formulario PCT/ISA/220 o con anterioridad al vencimiento de 22 meses desde la fecha de la prioridad, la que sea posterior.

Para más opciones, véase el Formulario PCT/ISA/220.

3. Para más detalles, véase las notas al Formulario PCT/ISA/220

Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/KR	Fecha de finalización de esta opinión	Funcionario autorizado
Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea	28 de junio de 2010 (28-06-2010)	Jung Da Won
Complejo Gubernamental-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, República de Corea		Nº Telefónico: 82-42-481-8147
Nº de Fax 82-42-472-7140		

Formulario (PCT/ISA/237) (Carátula) (julio de 2009)

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2009/063921
Casillero N° I. Fundamento de esta opinión.	
1. Con respecto al idioma, esta opinión se ha establecido basada en: ☒ la solicitud de patente internacional en el idioma en que se presentó. ☐ una traducción de la solicitud de patente internacional al _____, que es el idioma de la traducción provista para los propósitos de la búsqueda internacional (Normas 12.3 y 23.1(b)). 2. ☐ Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error evidente autorizada o notificada por esta autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43bis.1(a)). 3. Con respecto a todas las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que se revelan en la solicitud de patente internacional, esta opinión se ha establecido basado en: a. un listado de secuencias presentado o provisto ☐ en papel ☐ una forma electrónica b. fecha de presentación o provisión	

☐ contenido en la solicitud de patente internacional presentada

☐ presentado junto con la solicitud de patente internacional en forma electrónica

☐ provisto con posterioridad ante esta Autoridad con propósitos de búsqueda.

3. ☐ Además, en caso de que se haya presentado o provisto más de una versión o copia de un listado de secuencias, se prestaron las declaraciones requeridas de que la información de las copias posteriores o adicionales es idéntica a aquella de la solicitud de patente presentada o no va más allá de la solicitud de patente presentada, según corresponda.

5. Comentarios adicionales

OPINIÓN ESCRITA DE LA Solicitud de Patente Internacional N°
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA PCT/US2009/063921
INTERNACIONAL

**Casillero N° III. No establecimiento de opinión sobre la
novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial**

Las cuestiones sobre si la invención reivindicada parece
novedosa, involucra un paso inventivo (no es obvia) o es
aplicable industrialmente no se han examinado con respecto a:

☐ la solicitud de patente internacional completa

☒ las reivindicaciones N° 1-11

porque:

☒ la solicitud de patente mencionada, o las reivindicaciones
mencionadas N° 1-11 se relacionan con la siguiente materia que
no requiere un examen preliminar internacional (especifique):

El objeto de las reivindicaciones 1-11 no necesita una opinión
con respecto a la aplicabilidad industrial ya que se refiere a
un método para el tratamiento del ser humano mediante terapia
(Norma 43bis.1(b); Norma 67.1(iv) del PCT).

☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (indique
los elementos particulares a continuación) o las
reivindicaciones mencionadas N° son tan poco claras que no

se puede formar una opinión sensata (especifique):

☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones mencionadas N° ____ están tan insuficientemente sostenidas por la descripción que no se pudo formar ninguna opinión sensata.

☒ no se ha establecido ningún informe de búsqueda internacional para las reivindicaciones mencionadas N° 1-11

☐ no se pudo formar una opinión sensata sin el listado de secuencias; el solicitante, dentro del plazo establecido, no:

☐ proporcionó un listado de secuencias en papel que cumpla con la norma establecida en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estaba disponible para la Autoridad de Búsqueda Internacional en una forma aceptable para ella.

☐ proporcionó un listado de secuencias en forma electrónica que cumpla con la norma establecida en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad de Búsqueda Internacional en una forma aceptable para ella.

☐ pagó el arancel por provisión tardía establecido para la provisión de un listado de secuencias en respuesta a una invitación conforme a la Norma 13ter.1(a) o (b).

☐ Véase el Casillero Suplementario para más detalles.

Formulario PCT/ISA/237 (Casillero N° III) (julio de 2009)

OPINIÓN ESCRITA DE LA Solicitud de Patente Internacional N°
 AUTORIDAD DE BÚSQUEDA PCT/US2009/063921
 INTERNACIONAL

Casillero N° V. Declaración fundamentada conforme a la
Cláusula 35(2) sobre la novedad, paso inventivo o
aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que
fundamentan dicha declaración.

1. Declaración

Novedad (N) Reivindicaciones 12-17 SÍ

Reivindicaciones NINGUNA NO

Paso Inventivo(IS) Reivindicaciones: NINGUNA SÍ

Reivindicaciones 12-17 NO

Aplicabilidad industrial (IA) Reivindicaciones 12-17 SÍ

Reivindicaciones: NINGUNA NO

2. Citas y explicaciones:

En esta opinión escrita se citan los siguientes documentos:

D1: WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
 CALIFORNIA et al.) 27 de septiembre de 2007

D2: US 2007-0105133 A1 (CLARKE, MICHAEL F. et al) 10 de mayo
 de 2007

D3: US 2004-0248219 A1 (BLASCHUK, OREST W. et al.) 9 de
 diciembre de 2004

D4: TOMITA, KYOICHI et al. Investigación en Cáncer. 1 de julio
 de 2000, Vol.60, páginas 3650-3654.

1. Novedad y Paso Inventivo

1.1. Reivindicación 12

D1, que se considera el arte previo más cercano al objeto de la reivindicación 12, revela un método de diagnóstico de cáncer urogenital que sobreexpresa una proteína N-cadherina, el método comprende los pasos de: (a) obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o la ausencia de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de ensayo comparada con una muestra de tejido control de un individuo que se sabe que es negativo para el cáncer. (véanse el resumen, los párrafos [0009], [0010], las reivindicaciones 1, 5-9 de D1.)

La reivindicación 12 difiere de D1 en la descripción del método de uso de una muestra de tejido tal como suero o sangre, no las células madre cancerosas. Sin embargo, se conoce un método de detección de células madre tumorales así como marcadores de cáncer de células madre novedosas de D2. (véase el resumen, párrafos [0018], las reivindicaciones 1-7 de D2). Por consiguiente, la reivindicación 12 habría sido obvia sobre D1 en vista de D2. En consecuencia, la reivindicación 12 carece de paso inventivo de acuerdo con la Cláusula 33(3) del PCT.

1.2. Con referencia a las reivindicaciones 13-17

Las características adicionales de la reivindicaciones 13-17 que dependen de la reivindicación 12 son idénticas a la característica de la muestra de tejido tal como tejido de cáncer de vejiga y los tipos de de cáncer tales como cáncer de próstata, cáncer de vejiga, un cáncer de próstata refractario de hormonas y un cáncer metastático de D1. En consecuencia, las reivindicaciones 13-17 carecen de paso inventivo conforme a la Cláusula 33(3) del PCT.

3. Aplicabilidad Industrial

Las reivindicaciones 12-17 tienen aplicabilidad industrial conforme a la Cláusula 33(4) del PCT.

Formulario PCT/ISA/237 (Casillero N° V) (julio de 2009)

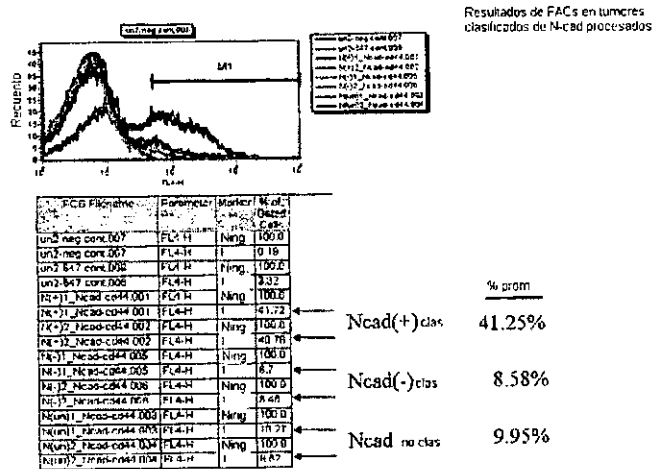


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

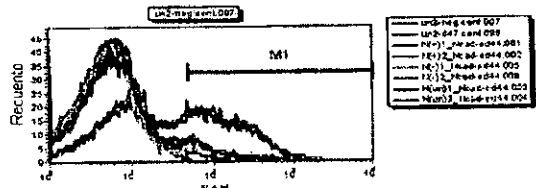
(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud: 08-06-2011				(71) Solicitante(s) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA	
(30) Prioridad SI	(31) No. Prioridad 12/268,302	(32) Fecha 10/11/2008	(33) País US	(72) Inventor(es) REITER, Robert E.	
				(74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 14/05/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 10-11-2009				N° publicación: WO 2010/054397 A3	
No. de solicitud PCT/US2009/063921					
(54) Titulo: N-CADHERINA: BLANCO PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA DE CÁNCER					

Reivindicación(es):



1. Un método de tratamiento de un paciente con cáncer, que comprende las etapas de:
- (a) obtener una muestra de tejido de ensayo de un individuo en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina;

(b) determinar la presencia o ausencia o la cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de ensayo en comparación con una muestra de tejido de control de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; diagnosticando así dicho cáncer que



Resultados de FACs en tumores clasificados de N-cad procesados

FCS Filename	Parameter	Marker	% of Gated Cells
un2-neg cont.007	FL4-H	Ning.	100.0
un2-neg cont.007	FL4-H	1	0.18
un2-047 cont.008	FL4-H	Ning.	100.0
un2-047 cont.008	FL4-H	1	3.32
N(+)-1_Ncad-cd44.001	FL4-H	Ning.	100.0
N(+)-1_Ncad-cd44.001	FL4-H	1	41.72
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	Ning.	100.0
N(+)-2_Ncad-cd44.002	FL4-H	1	40.78
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	Ning.	100.0
N(-)-1_Ncad-cd44.005	FL4-H	1	0.7
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	Ning.	100.0
N(-)-2_Ncad-cd44.006	FL4-H	1	8.46
N(un)1_Ncad-cd44.003	FL4-H	Ning.	100.0
N(un)1_Ncad-cd44.003	FL4-H	1	10.77
N(un)2_Ncad-cd44.004	FL4-H	Ning.	100.0
N(un)2_Ncad-cd44.004	FL4-H	1	8.57

% prom

Ncad(+) clas 41.25%

Ncad(-) clas 8.58%

Ncad no clas 9.95%



No. 11-070978- -00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 274



CIONES

No. 11-070978- -00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:36:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

n 486/00

PATENTE DE INVENCION ☐

- ☐ 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 ☐

Doctor(a)
MAYA RODRIGUEZ CARLOS ORLANDO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

REFERENCIA	Radicación No.	11 070978
	Solicitud internacional	PCT/US2009/063921
	Fecha inicio fase nacional	10/06/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

E12043

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones

05 AGO. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11