

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-070983-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:38:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

TM TAMAYO  
ROYALTIES · PATENTS · TRADEMARKS



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
División de Nuevas Creaciones

**PCT**  
SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

**11-70983**

54. TITULO ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS  
CONTRA N-CADHERINA

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

Ind. C. L. L. C.  
2011-06-08

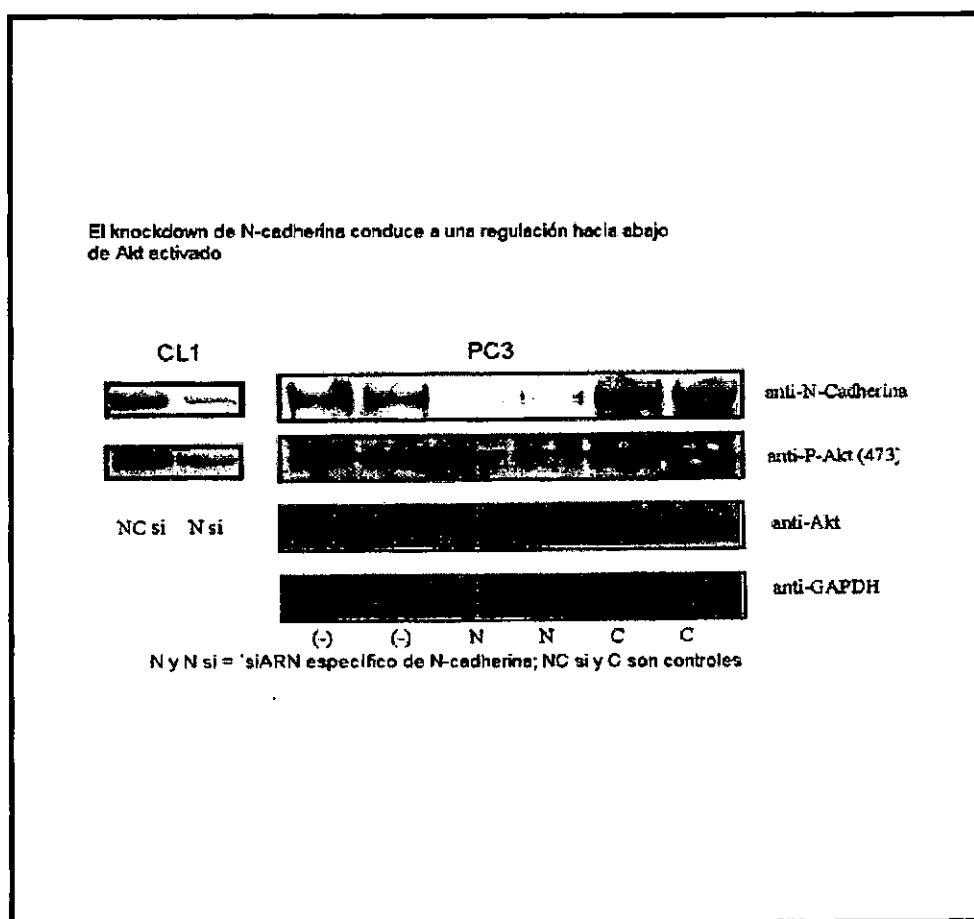
| PETICION                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <br>No. 11-070983-00000-0000                                |                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Fecha: 2011-06-08 15:38:50    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR<br>Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI<br>Act. 411 PRESENTACION    Folios: 247 |                                                                                                                                                                                                               |
| FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE<br>PCT<br>ENTRADA EN FASE NACIONAL                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 1. SOLICITUD DE:                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capitulo I <input type="checkbox"/> Capitulo II                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 2.<br><br>SOLICITANTE<br><br>(71)                                                                                                                       | Nombre:<br>THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA<br>Dirección:<br>1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, California<br>Nacionalidad o Domicilio:<br>Oakland, California 94607-5200, USA<br>Lugar de Constitución:                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                               | IDENTIFICACION<br><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br><br>Cual _____<br><br>Número: _____                    |
|                                                                                                                                                         | Teléfor _____ Fax: _____<br>E-mail: _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 3.<br><br>REPRESENTANTE<br>O APODERADO                                                                                                                  | Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ<br>Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2<br>Bufete 230. Parque Central Bavaria<br>Teléfor 3419841    Fax: 2435423<br>E-mail: info@tmtamayo.com                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                               | IDENTIFICACION<br><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br><br>Cual _____<br><br>Número: 17.117.818    TP: 17.402 |
|                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 4.<br><br>INVENTOR(ES)<br><br>(72)                                                                                                                      | Nombres: 1.- REITER, Robert E<br>2.- LEPIN, Eric<br>3.- WU, Anna M<br><br>Dirección: 1.- 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, California 90024-6017, USA.<br>2.- 700 Westwood Plaza, Los Angeles, California 90095, USA.<br>3.- 14919 Sutton Street, Sherman Oaks, California 91043, USA.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: 1.- CIUDADANO DE EE.UU.<br>2.- CIUDADANO DE EE.UU.<br>3.- CIUDADANA DE EE.UU. |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 5. PCT (86)<br>Solicitud internacional No. PCT/US2009/063881    Fecha: 10-nov-09<br>Publicación internacional No. WO 2010/054377 A9    Fecha: 14-may-10 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 6. Título (54)<br>ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA N-CADHERINA.                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 7. Clasificación Internacional (51) C09K 16/18 - C12N 15/13 - G01N 33/574                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 8. Prioridad                                                                                                                                            | (33) País de Origen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | (32) Fecha                                                                                                                                    | (31) Número de Solicitud                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                                                                         | US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 10-nov-08                                                                                                                                     | 61/113,042                                                                                                                                                                                                    |
| Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| 9. Comprobante de pago No. 11-0046946    Fecha 17/05/2011    Solicitud                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                               |
| Comprobante de pago No. 11-0046949    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; PCT/ISA/237.

## 11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZFIRMA: 

C.C. 17.117.818 TP 17.402

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0046946

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. UNDITARIO | 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. 11-070983- -00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:38:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 17 de 2011 - 12:21:09

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0046949

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 LINDITARIO | Vr CONCEPTO  |
|------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|--------------|
| 17   | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES | 27.000.00     | 459.000.00   |
|      |                         |                                                           |               | \$459.000.00 |

=====

SON: \*\*CUATROCIENTOS CINCUENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-070983-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:38:50  
Tra: 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 247

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
14 May 2010 (14.05.2010)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2010/054377 A9

- (51) International Patent Classification:  
C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2009/063881

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
61/113,042 10 November 2008 (10.11.2008) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): REITER, Robert,  
E. [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Angeles, Cali-  
fornia 90024-6017 (US). LEPIN, Eric [US/US]; 700  
Westwood Plaza, Los Angeles, California 90095 (US).
- WU, Anna, M. [US/US]; 14919 Sutton Street, Sherman  
Oaks, California 91043 (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,  
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,

[Continued on next page]

(54) Title: FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST N-CADHERIN

N-Cadherin Knockdown Leads to Downregulation  
Of Activated Akt

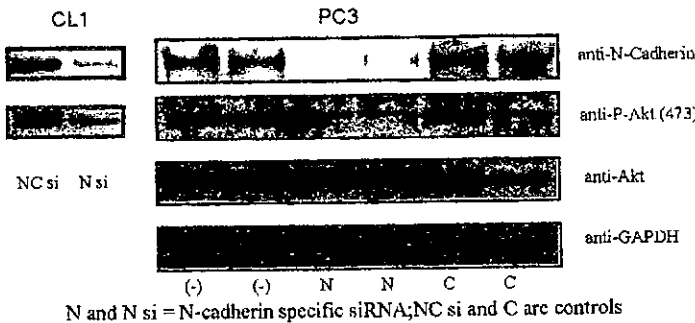


FIG. 15

(57) Abstract: The present application provides fully human antibodies against N-Cadherin for therapeutic and diagnostic meth-  
ods in cancer.

WO 2010/054377 A9

**FULLY HUMAN ANTIBODIES AGAINST N-CADHERIN****CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS**

- 5 [0001] This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 61/113,042, filed on November 10, 2008, which is incorporated herein by reference.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER  
FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT**

10

[0002] NIH/NCI SOMI Training Grant, R25 CA 098010, M. Phelps/A. Wu, Directors  
NIH/NCI UCLA Prostate SPORE, P50 CA 092131, R. Reiter/A. Wu. The government has  
certain rights in this invention.

15

REFERENCE TO A "SEQUENCE LISTING," A TABLE, OR A COMPUTER  
PROGRAM LISTING APPENDIX SUBMITTED ON A COMPACT DISK

[0003] NOT APPLICABLE

20

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

- [0004] Prostate cancer is the most common malignancy and the second leading cause of  
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  
25 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  
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  
30 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*, 100: 3410-3415 (2003)).

[0005] 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*, 5 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 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 10 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 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.

[0006] In order to identify new candidate serum or tissue markers of hormone refractory prostate cancer, we have previously compared gene expression profiles of paired hormone dependent and hormone refractory prostate cancer xenografts. The LAPC-9 xenograft was established from an osteoblastic bone metastasis and progresses from androgen dependence to independence following castration in immune deficient mice (Craft et al., *Cancer 15 Research*, In Press (1999)). It has been used previously to identify candidate therapeutic targets in prostate cancer. Differentially expressed genes were validated and then examined for sequence homology to secreted or cell surface proteins. N-Cadherin has been identified as a marker of cancer. The identification, characterization and initial validation of N-Cadherin, which is expressed in both hormone refractory prostate cancer and bladder cancer, 20 has been previously reported (WO/2007/109347).

[0007] One type of cell movement than can be observed in embryogenesis requires the loss of cell-cell contacts for the migration of individual cells or small group of cells through the extracellular matrix. This process is called epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT also occurs in pathological situations, such as the acquisition of a motile and invasive 30 phenotype of tumor cells of epithelial origin. A hallmark of EMT, is the loss of E-cadherin and the de novo expression of N-cadherin adhesion molecules. N-cadherin promotes tumor cell survival, migration and invasion, and high levels of N-cadherin expression is often associated with poor prognosis. N-cadherin is also expressed in endothelial cells and plays an essential role in the maturation and stabilization of normal vessels and tumor-associated

angiogenic vessels. Increasing experimental evidence suggests that N-cadherin is a potential therapeutic target in cancer.

5 [0008] The function of N-cadherin has been studied at the molecular level. N-cadherin N-terminal extracellular region (160 to 724 a.a) consists of 5 domains (ECD1-ECD5). ECD1 and ECD2 are the minimal domains required for intracellular adhesion but if all extracellular domains are involved, the level of adhesion is strengthened. In addition a study has shown that a 69 amino acid portion of ECD4 was found to be essential in migration and mobility but not in cellular adhesion (Kim et al. *J Cell Biol* 2000).

10 [0009] Accordingly, the invention provides compositions and methods which target N-Cadherin in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancers expressing N-Cadherin including, but not limited to, prostate cancer and bladder cancer. Antibodies, and fragments thereof, which are specific to the extracellular domains of N-cadherin, are also reported herein.

15 BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] The present application provides fully human antibodies against N-Cadherin for therapeutic and diagnostic methods in cancer, e.g., prostate and bladder cancer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 20 [0011] Figure 1. Enrichment in anti-N-cadherin phage antibody through successive panning rounds.
- [0012] Figure 2. A14, C7, E4 and D4 diabody staining of PC3 cells.
- [0013] Figure 3. Binding of C7 diabody to N-cadherin negative cells.
- [0014] Figure 4. Specific binding of E4 and D4 diabodies to N-cadherin expressing cells.
- 25 [0015] Figure 5. Tumor localization of <sup>124</sup>I labeled D4 Db in LAPC9 AI tumors.
- [0016] Figure 6. N-cadherin activates NF-κB.
- [0017] Figure 7. N-cadherin activates NF-κB.
- [0018] Figure 8. N-cadherin is expressed on cell surface of C1 cells.
- [0019] Figure 9. NF-κB localizes to nucleus in N-Cadherin positive cells (C1).

[0020] **Figure 10.** N-Cadherin expression results in induction of IL-6, IL-8, TGF  $\beta$ 2, and bcl-2.

[0021] **Figure 11.** Correlation of induced genes with N-Cadherin level.

[0022] **Figure 12.** N-Cadherin knockdown leads to downregulation of IL-6 and IL-8.

5 [0023] **Figure 13.** NF- $\kappa$ B activity after N-Cadherin antibodies treatment.

[0024] **Figure 14.** Ncad in PC3 cells: 48hr antibody incubation.

[0025] **Figure 15.** N-Cadherin knockdown leads to downregulation of activated Akt.

[0026] **Figure 16.** N-Cadherin specific antibodies activate, then downregulate Akt activation.

10

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0027] We report here the method of treating a cancer patient and the method of identifying cancer stem cells, 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. In addition, we reported here antibodies, and fragments thereof, which are specific to the extracellular  
15 domains of N-cadherin.

15

[0028] 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  
20 invasive and metastatic prostate cancer.

20

[0029] This invention relates to the discovery that 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. We have found that targeting N-cadherin even in 5% of prostate cancer cells is sufficient to block the  
25 progression of prostate cancers to castration resistance.

25

[0030] This invention also relates to N-cadherin as a target in cancer stem cells. We have found that targeting of N-cadherin in 5% or fewer cells is sufficient to block tumor progression. This discovery 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  
30 growth of the tumor as a whole.

30

[0031] This invention further relates to the discovery that 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.

[0032] Accordingly, N-Cadherin is an especially promising therapeutic target. It is found on cell surfaces, expressed in many epithelial tumors, and is associated with invasion, metastasis and possibly androgen independence. Antibodies against N-cadherin therefore are a particularly preferred agent for use in treating epithelial cancers, including but not limited to 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, first to third domains, or fourth extracellular domain of N-cadherin are preferred in treating these cancers. In some embodiments, use of a 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.

[0033] Here we describe the selection and characterization of human ScFvs specific to two independent N-cadherin recombinant proteins: N-cadherin extracellular domains one to three (ECD1-3) and N-cadherin forth domain (ECD4). The two independent screens were designed in an effort to generate specific reagents able to affect the adhesion and migration phenotype of this molecule as well as generating reagents to target N-cadherin expressing cells.

Individual phage clones from the fourth panning round were characterized by ELISA and flow cytometry. Specific binders were sequenced and some of the selected clones were reformatted into small bivalent antibody fragments (diabodies). The diabodies show specific binding to N-cadherin expressing cells.

[0034] Anti-N-cadherin fragments, as described here, are the basic building block upon which can be fabricated human whole antibodies or engineered antibodies of varying shapes and sizes, the primary attribute of which is the ability to bind specifically to the N-cadherin protein. These antibodies can be used for the treatment or diagnosis of prostate, bladder or other cancers expressing the N-cadherin protein. It is important to note that N-cadherin expression in the tumor can be by the tumor cells themselves or any of the surrounding

stroma (muscle, fibroblasts, blood vessels etc). We have previously shown that N-cadherin is an important biological determinant of invasion, growth, metastasis and progression of prostate, bladder and other cancers and is a critical diagnostic, prognostic, and therapeutic target. Murine monoclonal antibodies against N-cadherin are able to block tumor growth, metastasis, invasion and progression to androgen independence in animal models of cancer. The discovery of human scFV's that can easily be reformatted into whole or engineered antibodies provides the ability to target cancers without inciting an immune response against the antibodies.

[0035] To our knowledge, we describe the first human antibody fragments against N-cadherin derived with the goal of prostate and other cancer diagnosis and treatment. The invention is predicated on prior art developed by our group implicating N-cadherin in prostate and bladder and other cancer progression, as well as the concept of targeting it therapeutically. Phage display describes a well established technique for the isolation of antibody fragments. The non-immune phage library used here was developed by Dr. JD Marks at UC. San Francisco.

[0036] The invention describes the isolation and characterization of single chain fragments that recognize N-cadherin. These can be use as single chain fragments or reformatted into larger fragments, such as whole IgG, that can be used for the diagnosis or treatment of cancers.

[0037] As stated, the invention describes a number of candidate fragments with putative diagnostic and therapeutic utility that can be reformatted into larger constructs and used to recognize N-cadherin in prostate and other cancers. These antibodies can be used by themselves (naked antibodies) or conjugated to radioisotopes, nanoparticles, liposomes, virus or any other "payload" for delivery to tumors for therapy, imaging or other purpose. The fragments can be used to increase the specificity of any therapy or imaging modality for N-cadherin expressing tumors.

[0038] To our knowledge, we are the first to show that antibodies against N-cadherin have therapeutic activity, superior to any other known means of targeting such tumors. The advantage of this invention is that the antibody fragments are nonimmunogenic and human and can be used in patients without additional modification. Also, fragments recognizing N-cadherin have the advantage of flexibility, in that they can easily be engineered for almost any purpose.

Definitions

[0039] "N-Cadherin and E-Cadherin" refer 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 5 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 Figure 7, 8, and 9, respectively; (2) specifically bind to antibodies, e.g., polyclonal antibodies, raised against an immunogen comprising a referenced amino acid 10 sequence as depicted in Figures 7, 8, and 9, 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 7, 8, and 9, respectively, and conservatively modified variants respectively thereof; (4) have a nucleic acid sequence that 15 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 7, 8, and 9. A polynucleotide or polypeptide sequence is typically from a mammal including, but not limited to, primate, e.g., human; rodent, e.g., rat, mouse, 20 hamster; cow, pig, horse, sheep, or any mammal. The nucleic acids and proteins of the invention include both naturally occurring or recombinant molecules.

[0040] "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, 25 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.

[0041] The cancer to be treated herein may be one characterized by excessive activation of 30 N-cadherin. Alternatively, the cancer to be treated herein may be one where the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or one where the N-cadherin protein is expressed by a subset of cells, and where the N-cadherin protein is not overexpressed. In one embodiment of the invention, a diagnostic or prognostic assay will be performed to determine whether the patient's cancer is characterized by expression of N-cadherin. Various assays for

determining such amplification/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 to be treated is not yet invasive, but expresses N-cadherin.

[0042] "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.

[0043] "Overexpression" refers to RNA or protein expression of N-Cadherin, LY6-E, and E-Cadherin in a test tissue sample that is significantly higher than RNA or protein expression of N-Cadherin, LY6-E, and E-Cadherin, respectively, in a control tissue sample. In one embodiment, the tissue sample is autologous. Cancerous test tissue samples (e.g., bladder, prostate) associated with invasiveness, metastasis, hormone independent (e.g., androgen independence), or refractoriness to treatment or an increased likelihood of same typically have at least two fold higher expression of N-Cadherin or LY6-E mRNA or protein, often up to three, four, five, eight, ten or more fold higher expression of N-Cadherin, or LY6-E in comparison to cancer tissues from patients who are less likely to progress to metastasis or to normal (i.e., non-cancer) tissue samples. Such differences may be readily apparent when viewing the bands of gels with approximately similarly loaded with test and controls samples. Prostate cancers expressing increased amounts of N-Cadherin or Ly6-E are more likely to become invasive, metastasize, or progress to androgen independent or treatment refractory cancer. Various cutoffs are pertinent for N-Cadherin or Ly6-E positivity, since it is possible that a small percentage of N-Cadherin or Ly6-E positive cells in primary tumors may identify tumors with a high risk for recurrence and metastasis. The terms "overexpress," "overexpression" or "overexpressed" interchangeably refer to a gene that is transcribed or translated at a detectably greater level, usually in a cancer cell, in comparison to a normal cell. Overexpression therefore refers to both overexpression of protein and RNA (due to increased transcription, post transcriptional processing, translation, post translational processing, altered stability, and altered protein degradation), as well as local overexpression

due to altered protein traffic patterns (increased nuclear localization), and augmented functional activity, e.g., as in an increased enzyme hydrolysis of substrate. Overexpression can also be by 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more in comparison to a normal cell or comparison cell (e.g., a BPH cell).

- 5 [0044] 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.

- 10 [0045] 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 expressed or stabilized with minimal degradation in a cancer cell in comparison to a normal cell, for instance, 2-fold expression, 3-fold expression 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.

- 25 [0046] E-cadherin is conversely typically underexpressed in cancerous tissue samples in tissue samples from cancer patients which are likely to become invasive, metastasize, or progress to androgen independent or treatment refractory cancer. This underexpression may be two-fold, three-fold, four-fold, or at least five-fold. Such differences may be readily apparent when viewing the bands of gels with approximately similarly loaded with test and controls samples. The combined N-cadherin/E-cadherin values in cancers which are likely to become invasive, metastasize, or progress to androgen independent or treatment refractory cancer, are therefore even greater and can be at least two-fold, three-fold, four-fold, five-fold, ten-fold, or twenty-fold greater. Various cutoffs are pertinent for N-Cadherin positivity/e-cadherin negativity, since it is possible that a small percentage of N-Cadherin positive cells in primary tumors may identify tumors with a high risk for recurrence and metastasis.

[0047] 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.

5 [0048] 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.

10 [0049] "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  
15 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,  
20 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,  
25 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  
30 polynucleotide of the invention relative to the control is 110%, optionally 150%, optionally 200-500%, or 1000-3000% higher.

[0050] 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  
5 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  
10 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.

[0051] 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  
15 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.

[0052] 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-  
20 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  
25 cytoskeletal-interacting drug includes 2-methoxyestradiol.

[0053] 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  
30 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.

**[0054]** 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 (e.g., see, Figure 5) 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

**[0055]** 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 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. 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 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

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.

5 [0056] 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 synthesized oligonucleotides are cleaved, tailored, and re-ligated in the form desired.

10 [0057] 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 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,  
15 "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 sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

20 [0058] "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 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  
25 (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 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.,  
30 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 concentrations (e.g., cAMP, IP3, or intracellular Ca<sup>2+</sup>); identification of downstream or reporter gene expression (CAT, luciferase,  $\beta$ -gal, GFP and the like), e.g., via

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

[0059] 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.

[0060] "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.

[0061] 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.

[0062] 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 be "substantially identical." This definition also refers to, or may be applied to, the 10 compliment 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.

[0063] 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.

[0064] 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)).

- [0065] 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 [0066] "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

23

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).

[0067] Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly  
5 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 deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J.*  
10 *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.

[0068] A particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses "splice variants." Similarly, a particular protein encoded by a nucleic acid implicitly encompasses any protein  
15 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 splicing of exons. Alternate polypeptides derived from the same nucleic acid by read-through  
20 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).

[0069] The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to  
25 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.

[0070] The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as  
30 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,  $\gamma$ -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  $\alpha$  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.

[0071] 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.

[0072] "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 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 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 not with respect to actual probe sequences.

[0073] 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.

[0074] 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)).

[0075] 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  $^{32}\text{P}$ , 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.

[0076] 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.

[0077] 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 two or more subsequences that are not found in the same relationship to each other in nature (e.g., a fusion protein).

[0078] 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

5 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  
 10 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.

15 [0079] 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  
 20 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.,  
 25 and *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, *et al.*, John Wiley & Sons.

[0080] 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  
 30 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.).

[0081] "Antibody" refers to a polypeptide comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an antigen.

5 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  
10 will be most critical in specificity and affinity of binding.

[0082] 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  
15 for antigen recognition. The terms variable light chain ( $V_L$ ) and variable heavy chain ( $V_H$ ) refer to these light and heavy chains respectively.

[0083] 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  $F(ab)'_2$ ,  
20 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  
25 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*  
30 348:552-554 (1990)).

[0084] 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  
 5 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  
 10 antigenic specificity (*see, e.g.*, Kuby, *Immunology* (3<sup>rd</sup> 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;  
 15 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  
 20 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  
 25 immunotoxins (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; and EP 03089).

[0085] 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  
 30 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); Verhoeven *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

29

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  
5 CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

[0086] 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  
10 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.

[0087] 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  
15 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.

[0088] The immunoconjugate can be used for targeting the effector moiety to a N-cadherin positive cell, particularly cells, which express the N-cadherin or Ly6 protein. Such differences can be readily apparent when viewing the bands of gels with approximately  
25 similarly loaded with test and controls samples.. Examples of cytotoxic agents include, but are not limited to ricin, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidum bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, and glucocorticoid and other chemotherapeutic agents, as well as radioisotopes. Suitable  
30 detectable markers include, but are not limited to, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme.

[0089] 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 useful in blocking invasiveness. Suitable N-cadherin antibodies for use according to the invention include, but are not limited to, GC4, 1H7, 1F12, 2B3.

[0090] Additionally, the recombinant protein of the invention comprising the antigen-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, ethidum bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, ricin, abrin, glucocorticoid and radioisotopes.

[0091] Techniques for conjugating therapeutic agents to antibodies are well known (see, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)).

[0092] 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. 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 immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific

5 immunoreactivity).

[0093] 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,  
10 *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)).

[0094] The term "pharmaceutically acceptable salts" or "pharmaceutically acceptable carrier" is meant to include salts of the active compounds which are prepared with relatively  
15 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,  
20 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 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,  
25 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,  
30 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.

5 [0095] 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.

10 [0096] 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.

15 [0097] 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.

20 [0098] 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.

25 [0099] 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.

30 E-Cadherin is a cell surface protein involved in epithelial cell-cell adhesion which is commonly lost in invasive and metastatic solid tumors.

#### **Detailed Embodiments**

[0100] The present invention provides methods of treating a cancer patient. The methods generally comprise 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; 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 is not overexpressed; and (c) administering an effective amount of N-cadherin antibody to the individual at risk of having a cancer that expresses a N-Cadherin protein. Typically, the tissue sample is serum, but can also be a tissue from a biopsy, 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%, 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 art.

[0101] In another embodiment, the detection methods can be carried out by contacting a test tissue sample from an patient 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 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 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.

[0102] The methods find particular application in the 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.

5 [0103] Treatment will generally involve the repeated administration of the anti- N-Cadherin antibodies via an acceptable route of administration such as intravenous injection (IV), at an effective dose. 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  
10 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 per week may be effective and well tolerated, although even higher  
15 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 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  
20 administered similarly, provided the initial dose is well tolerated.

[0104] 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  
25 effectively without significant complications of antigenicity.

[0105] In some embodiments, the invention provides a method of treating cancer, 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  
30 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)<sub>2</sub>, or Fv. In other embodiments, the fragment comprises a recombinant protein having an antigen-binding region.

[0106] 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  
5 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  
10 ablation therapy. In some embodiments, the contacting comprises administering the antibody directly into the cancer or a metastasis of the cancer.

[0107] In some embodiments, the invention provides a method of treating a cancer patient. The method generally comprises (a) obtaining a test tissue sample from an individual at risk  
15 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; thereby diagnosing the 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 is not overexpressed; (c) determining whether a cancer is likely to become invasive, metastasize,  
20 hormone independent, or refractory treatment; (d) administering a chemotherapeutic agent, an immunotherapeutic agent, hormonal therapy, or radiotherapy according to whether there is an increased likelihood of the cancer becoming invasive, metastasizing, hormone independent, or refractory to treatment.

[0108] In some embodiments, the chemotherapeutic agent can be selected from the group  
25 consisting of ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, etiduum 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  
30 glucocorticoidricin.

[0109] The invention further provides methods of identifying cancer stem cells. The methods generally comprise (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

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.

[0110] In some embodiments, the invention comprises a monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 4 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence:

SEQ ID NO: 1:  
MAQVQLVQSGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMIWVRQAPGKGLEWVSSISGS  
SDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKATGYSYYYGMD  
10 VWGPGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASLGDRVITICRASQGIS  
NYLAWYQQKPGKAPKLLIYGATTLQHGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYFC  
QQAHSFPPTFGGGGTKLEIKR

[0111] In some embodiments, the invention comprises a monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domains 1-3 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence selected from the groups of:

SEQ ID NO 2:  
MAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSYIHWVRQAPGQGFWMGIINPS  
GGASAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELRSLR

SEQ ID NO 3:  
20 MAQVQLQESGWYFDLWGRGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASV  
GDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL  
TISSLQPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO 4:  
25 MAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISY  
DGRVKSYADAVKGRFTISRDNSENILYVQIDSLRVEDTAVYYCARRGGDHAAGMDV  
WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGGRSDIGG  
YNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVGNRPSGVSNRFSGSKSGNT

SEQ ID NO 5:  
30 MAPGAAGGVGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTXVYYCARLEYSSSSRAFD  
VWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSY

YASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC  
NSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO 6: MAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF

SEQ ID NO 7:

5 MAQVQLVQSGAEVKRPGASVRISCKASGYPTTYPIHWVRQAPGQGLEWMGGINPN  
SGATKNVQKFQGRVTMTADTSIRTAYMELSRLTSDDTAVYYCARGEGDTGSYLGG  
YWGLGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSY  
YASWYQQKPGRAPLLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNSASLTITGAQAEDEADYYCN  
SRDRSGNYLFGVGTKVTVLG

10 SEQ ID NO 8:

MAQVQLVQSGAEVKKPGESLEISCKGSGYSFANNWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYP  
GDSDVRYRSFSQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHRVAYSGYDAF  
DIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSVLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRS  
YYPSWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY  
15 CHSRDRSGNQVLFGGGTVTVLG

SEQ ID NO 9:

MAQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTW  
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGEGGVWG  
QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSAS

20 In some embodiments, this invention provides antibody fragments capable of binding to  
extracellular domains 1-3 of N-cadherin or extracellular domains 4 of N-cadherin, wherein  
the fragment is a scFv. In some embodiments, this invention provides antibody fragments  
capable of binding to extracellular domains 1-3 of N-cadherin or extracellular domains 4 of  
N-cadherin, wherein the fragment is a diabody. To generate diabodies the linker  
25 SGGGGSGGGGSGGGGS was replaced by SGGGGS

**Methods of Administration and Formulation**

[0112] 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  
30 by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal,  
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.

[0113] The compositions for administration will commonly comprise an agent as described herein (e.g., N-cadherin inhibitors, N-cadherin antibodies and immunoconjugates, N-cadherin 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 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.

[0114] 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).

[0115] 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.

[0116] 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.

10 [0117] 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 20 macroemulsions.

[0118] 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 25 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 30 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.

[0119] 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.

[0120] 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)propylphosphorothioic acid (WR-151327), see Green et al.

5 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

10 alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN); (Paracchini et al., Anticancer Res. 13:1607-1612 (1993)); selenoorganic compounds such as P251 (Elbesen); and the like.

[0121] 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

15 simultaneously exert their biological activities.

[0122] 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

20 immunotherapy as well as currently developed therapeutics.

[0123] 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

25 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

30 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.

A2

[0124] 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.

5 [0125] 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  
10 paraffin hydrocarbons.

[0126] Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intraarticular (in the joints), intravenous, intramuscular, intratumoral, intradermal, intraperitoneal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that  
15 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  
20 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.

[0127] 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.

25 [0128] 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  
30 can be the appropriate number of any of these in packaged form. The composition can, if desired, also contain other compatible therapeutic agents.

[0129] 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.

5 [0130] 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, 10 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 15 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 20 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.

[0131] 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. 25 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).

**EXAMPLES**

[0132] The following examples are offered to illustrate, but not limit the claimed invention.

30 **Example 1: Isolation and Characterization of Human ScFvs Specific to Human N-Cadherin**

**MATERIALS AND METHODS**

### **N-Cadherin recombinant protein expression and cell lines.**

[0133] Two independent N-cadherin recombinant proteins were generated (Z Wainberg); N-cadherin extracellular domains one to three (ECD1-3) and N-cadherin forth domain (ECD4). cDNA sequence was cloned using RT-PCR from mRNA preparation. Nucleic acid 160 to 497 for ECD1-3 and nucleic acid 489 to 603 were cloned into bacterial system of expression in frame with an 6 histidine tag and in vector in frame with an GST tag. Expression was induced with hours after induction the periplasmic fraction was isolated and recombinant protein purified using Ni-NTA chromatography. The protein was analyzed on SDS-PAGE for size and purity. LNCap N-cadherin transfected cells were generated. The complete N-cadherin cDNA was cloned into the vector and tranfected into LNCap by infection. PC3 cells and DU145 two Prostate cell lines were used to characterize the anti-N-cadherin antibody fragments isolated.

### **Phage library panning**

[0134] We panned a non immune phage library displaying human single-chain Fv (scFv), containing  $8.2 \times 10^8$  members generated in JD Marks laboratory as described previously (Sheets M.D. PNAS 1998). Phages were affinity-selected to N-cadherin recombinant proteins. ECD1-3 and ECD4 were separately absorbed onto two immunotubes (Nunc). The immunotubes were then washed with PBS, blocked with 4 % milk in PBS at room temperature for 2 hours then washed 3 times with PBS. 1ml aliquots of the phage-displayed scFv library ( $8.10^{11}$  pfu) were mixed with 1ml 8% MPBS and added to the antigen-coated immunotubes. Immunotubes were incubated 1 hour at room temperature. Immunotubes were then washed once with 0.05% Tween 20 in PBS and three times with PBS. Phage were eluted with 1ml of 100mM triethylamine for 5 minutes and neutralized with 0.5ml of 1M Tris-Hcl pH 7.4. Half the eluted phage for each rounds was frozen while the other half was used to infect TG1 cells. Phage amplification and purification were carried out as previously described (Sheets M.D. PNAS 1998). Selection included another 3 rounds of panning similar to the first round. 2ml of 40  $\mu$ l/ml was used to coat immunotubes for rounds 1 and 2, while 20  $\mu$ l/ml  $\mu$ l/ml was used to coat immunotubes for round 3 and 4. The numbers of washes progressively increased in round 2, 3 and 4. Polyclonal phage antibodies from round 1, 2, 3 and individual 95 clones from the 4<sup>th</sup> round of panning were evaluated by ELISA as previously described (ref Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97.).

### **ELISA screening of individual clones**

[0135] The binding of 95 individual phage clones to their target was determined by ELISA (Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97) (Poul M, et al. JMB Volume 301, Issue 5, Pages 1149-1161). The target used for selection was used to coat a 96 wells ELISA plate. The number of unique scFv was determined by fingerprinting the scFv genes with the restriction enzyme BstNI and confirmed by DNA sequencing.

**Reformatting scFvs into Diabodies.**

[0136] ScFv insert were cut out of the pHEN1 using NcoI and NotI restriction enzymes and cloned into the pSyn vector using the same restriction enzyme sites. To reformat scFv into diabody the linker from 15 to 5 a.a using splicing by overlapping extension PCR (SOE-PCR) (Yazaki PJ, et al. PEDS 2004 May;17(5):481-9). SOE-PCR products were cloned into the TOPO vector (invitrogen) and sequenced to verify that no mutations were generated from the PCR. The diabody constructs were finally cloned into the pSyn1 vector using NcoI and NotI restriction sites.

**Expression and purification of scFvs and Diabodies.**

[0137] ScFvs and diabodies cloned into pSyn1 were transfected into TG1 bacteria for protein expression. Bacteria were grown to a density of 0.5 O.D<sub>600nm</sub> before the expression was induced with 1mM IPTG. After four hours of induction the bacteria were spun down and the periplasmic fraction prepared. 6HIS tag proteins were purified on a Ni-NTA column. The eluted protein was dialyzed against PBS concentrated and filter.

**Biochemical Characterization**

[0138] Purified proteins were analyzed by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Native structural size was determined by size exclusion columns (Superdex 75) (Pharmacia).

**Flow Cytometry**

[0139] Flow cytometry was conducted to assess binding of phage antibody clones and diabodies to cellular N-cadherin. For phage antibody staining supernatant concentrated 20 times was used. Individual clones were grown in 20 ml 2TY to a density of 0.5 O.D<sub>600nm</sub> when phage were rescued with helper phages. After an overnight culture, monoclonal phage were harvested from the supernatant by precipitation with PEG/NaCl and resuspended in 1ml PBS/ 1%BSA. For flow cytometry staining,  $5 \times 10^5$  cells were incubated for one hour on ice with 100  $\mu$ l of 20x PEG concentrated phage antibody clone. Cells were washed in flow buffer (PBS 1%FBS, 1mM EDTA, 0.02% Sodium azide) and the phage antibody clones detected with monoclonal anti-M13 antibody (Amersham Biosciences). Cells were washed and stained with R-PE conjugated anti-mouse antibody. For diabody staining,  $5 \times 10^5$  cells

were incubated for one hour on ice with the diabody at a 2µg/ml concentration in flow buffer. Cells were washed and the diabody detected with 1/100 anti-c-Myc-biotin antibody in flow buffer. Cells were finally washed and stained with 1/40 Streptavidin-R-PE (SIGMA) in flow buffer.

5 **In Vivo studies**

[0140] D4Db protein was labeled with <sup>124</sup>I and injected in the tail vein of SCID mice bearing LAPC9 AI tumors and nude mice bearing PC3 tumors. MicroPET imaging was performed 4 and 20 hours post injection. Biodistribution was performed 20 hours post injection.

**Panning**

10 [0141] The same non immune phage library displaying human single-chain Fv antibodies (scFv), containing  $8.2 \times 10^8$  members were panned against ECD1-3-6His or ECD4-6His recombinant protein independently. Panning results including input, output, recovery and enrichment are presented in Table 1. Panning against ECD1-3 resulted in early enrichment starting from round 2, whilst enrichment only became superior to one at the last panning  
15 round for ECD4. These results are consistent with the polyclonal ELISA as a signal appeared at the second panning round with ECD1-3 while only the third panning round sample with ECD4 showed a signal.

[0142] As shown in FIG. 1, polyclonal Phage antibody from panning rounds 1, 2 and 3 were analyzed by ELISA. The targets used for panning rounds were used to coat the ELISA  
20 plate. Binding of phage antibody were detected with HRP conjugated anti-M13 antibody.

**Table 1**

a) ECD1-3

|         | Immobilized protein | Input (pfu)        | Output (pfu)    | Recovery             | Enrichment |
|---------|---------------------|--------------------|-----------------|----------------------|------------|
| Round 1 | 40 µl/ml            | $8 \times 10^{11}$ | $2 \times 10^6$ | $2.5 \times 10^{-6}$ |            |
| Round 2 | 40 µl/ml            | $5 \times 10^{10}$ | $2 \times 10^5$ | $4 \times 10^{-6}$   | 1.6        |
| Round 3 | 20 µl/ml            | $5 \times 10^{11}$ | $4 \times 10^6$ | $10^{-5}$            | 2.5        |
| Round 4 | 20 µl/ml            | $2 \times 10^{11}$ | $5 \times 10^8$ | $2.5 \times 10^{-3}$ | 250        |

b) ECD4

|         | Immobilized protein | Input (pfu)          | Output (pfu)    | Recovery              | Enrichment |
|---------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|------------|
| Round 1 | 40 µl/ml            | $8 \times 10^{11}$   | $2 \times 10^7$ | $1.25 \times 10^{-5}$ |            |
| Round 2 | 40 µl/ml            | $5 \times 10^{10}$   | $10^5$          | $2 \times 10^{-6}$    | 0.2        |
| Round 3 | 20 µl/ml            | $5 \times 10^{11}$   | $5 \times 10^4$ | $10^{-7}$             | 0.05       |
| Round 4 | 20 µl/ml            | $3.5 \times 10^{11}$ | $5 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^{-6}$  | 1.4        |

25

**Screening**

[0143] 95 clones were isolated from the forth round of selection for ECD1-3 and ECD4 and tested by ELISA. The 95 clones isolated from the forth round of selection for ECD1-3-6HIS were screened against ECD1-3-6HIS and ECD1-3-GST. 93 out of 95 clones were positive when tested on ECD1-3 6HIS. Twenty two of the clones positive for ECD1-3 6HIS were also positive of for ECD1-3-GST. The twenty two clones positive both for ECD1-3 6HIS and ECD1-3-GST were finger printed to isolate unique clones. 7 clones had only one copy A7, C7, C12, D10, E4, E10 and G2. B12 had one other copy. D4 had 3 other copies and A8 had 8 other copies. A8 NcoI-NotI insert was shorter that the other clones when analyzed on an agarose gel. The 95 clones isolated from the forth round of selection for ECD4-6HIS were screened against and ECD4-6HIS and ECD1-3 6HIS. All the 95 clones tested were positive when tested on ECD4-6HIS and negative when tested on ECD1-3 6HIS. We selected 8 of the positive clones that gave the stronger signal on ELISA and fingerprinted them. These 8 clones had the same fingerprint. One of these clones, A1 was renamed A14

[0144] In summary, we selected 10 individual phage clones that bind N-cadherin ECD1-3 recombinant protein (A7, A8, B12, C7, C12, D4, D10, E4, E10, G2) and one phage clone that binds N-cadherin ECD4 recombinant protein (A14) .

#### **Binding of phage clones to cell surface N-cadherin**

[0145] The eleven individual phage clones selected by ELISA were tested for cell binding of N-cadherin positive cells (PC3 and LNCaP N-cadherin transfected cells) by flow cytometry. Clones were also tested for cross-reactivity on N-cadherin negative cells (DU-145 and LNCap). For these experiments, a second batch of phage antibodies were generated and retested by ELISA. Both ELISA results for the selected clones are presented in Table 2. All phage clones except one D4 stained N-cadherin positive cells but not N-cadherin negative cells. The mean fluorescence intensity for each clone is presented in Table 2. We selected A14 as the only anti-ECD4 and the C7 and E4 as these phage antibody clones show the strongest cell staining to be reformatted into diabody. The diabody generated; A14Db, C7Db and E4 Db were used to stain N-cadherin positive and negative cells. A14Db and E4Db showed a comparable weak staining while C7 Db showed stronger staining of N-cadherin positive cells when analyzed by flow cytometry(data not shown). However C7Db also show staining of an N-cadherin negative cell.

[0146] scFv protein from these clones have been sequenced. The sequences are listed below:

A14ScFv

SEQ ID NO: 1

Table 2

| Clone             | Fusion protein  | Number of copies | 1 <sup>st</sup> ELISA (O.D) | 2 <sup>nd</sup> ELISA (O.D) | Flow Cytometry (MFI) |
|-------------------|-----------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| A14 (A1)          | HIS<br>Domain 4 | 1                | 0.32                        | ?                           | 57                   |
| A7                | GST<br>HIS      | 1                | 0.1<br>0.26                 | 0<br>0.38                   | 48                   |
| A8<br>(truncated) | GST<br>HIS      | 9                | 0.17<br>0.25                | 0.05<br>0.11                | 30                   |
| B12               | GST<br>HIS      | 2                | 0.2<br>0.18                 | 0.26<br>0.4                 | 91                   |
| C7                | GST<br>HIS      | 1                | 0.1<br>0.23                 | 0.19<br>0.35                | 110                  |
| C12               | GST<br>HIS      | 1                | 0.34<br>0.2                 | 0.16<br>0.31                | 38                   |
| D4                | GST<br>HIS      | 4                | 0.31<br>0.38                | 0.15<br>0.24                | 0                    |
| D10               | GST<br>HIS      | 1                | 0.22<br>0.24                | 0.13<br>0.28                | 25                   |
| E4                | GST<br>HIS      | 1                | 0.17<br>0.35                | 0.21<br>0.39                | 216                  |
| E10               | GST<br>HIS      | 1                | 0.13<br>0.21                | 0.14<br>0.35                | 12                   |
| G2                | GST<br>HIS      | 1                | 0.09<br>0.26                | 0.06<br>0.14                | 36                   |

Table 3

|          | Tumor | Blood | Liver | Spleen | Kidney | Lung |
|----------|-------|-------|-------|--------|--------|------|
| LAPC9 AI | 0.6   | 0.9   | 0.3   | 0.2    | 0.6    | 0.3  |
| PC3      | 0.3   | 0.6   | 0.3   | 0.1    | 0.6    | 0.3  |

Biodistribution data obtained 22h post injection of tumors or mice.

Tumor/blood = 0.7 (LAPC9) and 0.5 (PC3)

#### Selection of the best binder.

[0147] In an additional effort to select the best out of the 10 ECD1-3 binders, these phage clones were generated, depleted on LNCaP cells and panned twice against N-cadherin transfected LNCaP cells. Clones were sequenced. Although, staining of N-cadherin transfected LNCaP cells with D4 phage clones were negative, D4 clone was prevalent with X copies.

[0148] D4 diabody (D4Db) was generated and compared to E4Db for PC3 and DU145 staining (Figure 2). Both E4Db and D4Db stained PC3 and were negative for DU145. D4Db staining of PC3 was stronger than E4Db (FIG. 4).

[0149] As shown in FIG. 2, N-cadherin positive cells (PC3) were incubated with diabodies, stained and analyzed by flow cytometry. Secondary antibodies only: anti-C-Myc-FITC (filled in gray), A14 Db (dashed line), E4 Db (thin line) C7 Db (thick line).

5 [0150] As shown in FIG. 3, N-cadherin negative cells (DU 145) and N-cadherin positive cells (PC3) were incubated with C7 Db, stained and analyzed by flow cytometry. Secondary antibodies only: anti-C-Myc-FITC (filled in gray), C7 Db (solid line).

[0151] As shown in FIG. 4, N-cadherin negative cells (DU 145) and N-cadherin positive cells (PC3) were incubated with diabodies, stained and analyzed by flow cytometry. Secondary antibodies only: anti-C-Myc-biotin and streptavidin R-PE (filled in gray), E4 Db  
10 (dashed line), D4 Db (solid line).

[0152] FIG. 5 shows the tumor localization of <sup>124</sup>I labeled D4 Db in LAPC9 AI tumors. Coronal section registered 4h hours post injection.

[0153] 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  
15 suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of 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.

20

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1                   1.       A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to  
2 extracellular domain 4 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
- 1                   2.       The antibody of claim 1, wherein the fragment is a scFv.
- 1                   3.       The antibody of claim 1, wherein the fragment is a diabody.
- 1                   4.       A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to  
2 extracellular domain 1-3 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOs:  
3 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9.
- 1                   5.       The antibody of claim 4, wherein the fragment is a scFv.
- 1                   6.       The antibody of claim 4, wherein the fragment is a diabody.
- 1                   7.       A method of treating a cancer patient, 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 or amount of the N-cadherin protein  
5 in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to  
6 be negative for the cancer; thereby diagnosing said cancer that expresses a N-cadherin  
7 protein, wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is expressed  
8 by a subset of cells, or is overexpressed; and  
9                   (c) administering an effective amount of N-cadherin antibody or fragment of  
10 claims 1 or 4 to the individual at risk of having a cancer that expresses a N-Cadherin protein.
- 1                   8.       The method of claim 7, wherein said tissue sample is prostate or  
2 bladder tissue.
- 1                   9.       The method of claim 7, wherein said cancer is a prostate cancer.
- 1                   10.      The method of claim 7, wherein said cancer is a bladder cancer.
- 1                   11.      The method of claim 7, wherein said cancer is a hormone refractory  
2 prostate cancer.
- 1                   12.      The method of claim 7, wherein said antibody blocks hormone  
2 refractory prostate cancer.

- 1                   13.     The method of claim 7, wherein said antibody blocks cancer stem  
2     cells.
- 1                   14.     The method of claim 7, wherein said cancer is a metastatic cancer.
- 1                   15.     The method of claim 7, wherein said antibody is a monoclonal  
2     antibody.
- 1                   16.     The method of claim 7, wherein the antibody is a scFv.
- 1                   17.     The method of claim 7, wherein the antibody is a diabody.
- 1                   18.     A method of diagnosing a cancer patient, 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 or amount of the N-cadherin protein  
5     in the test tissue sample in comparison to a control tissue sample from an individual known to  
6     be negative for the cancer by contacting a sample with an effective amount of N-cadherin  
7     antibody or fragment of claims 1 or 4; thereby diagnosing said cancer that expresses a N-  
8     cadherin protein, wherein the N-cadherin protein is expressed at normal or low levels, or is  
9     expressed by a subset of cells, or is overexpressed.
- 1                   19.     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, using the antibodies of  
8     claims 1 or 4.
- 1                   20.     The method of claim 19, wherein said tissue sample is prostate or  
2     bladder tissue.
- 1                   21.     The method of claim 19, wherein said cancer is a prostate cancer.
- 1                   22.     The method of claim 19, wherein said cancer is a bladder cancer.

1/16

a.



b.

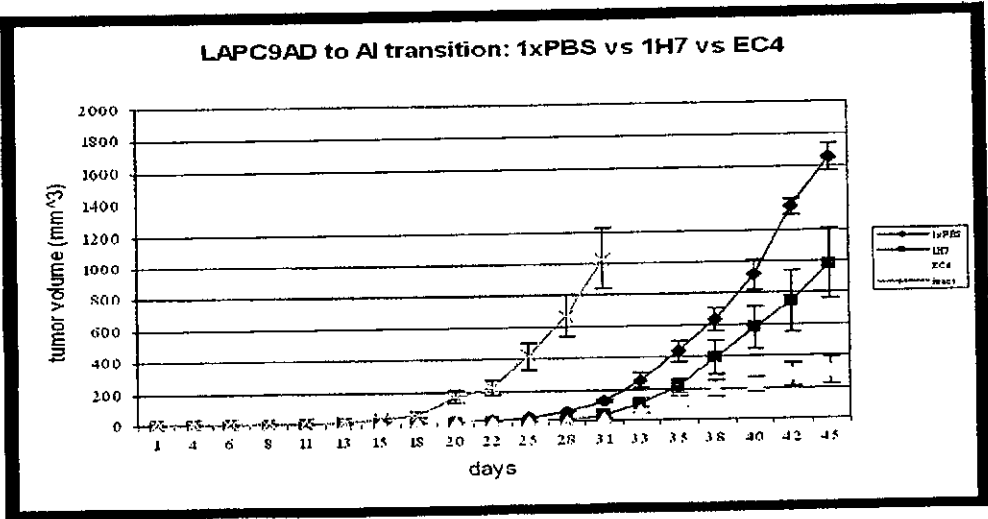


FIG. 1

Tumor Growth Curve of LAPC9AI sort

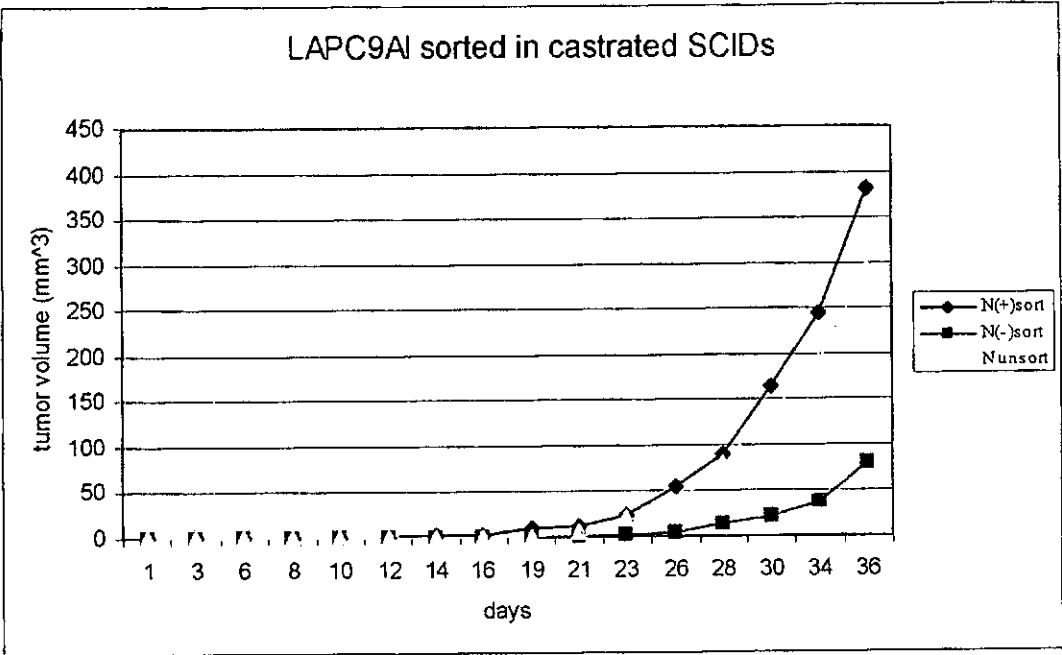
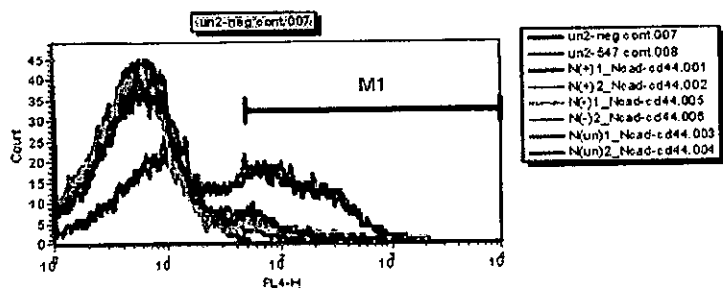


FIG. 2



FACs results on  
processed N-cad  
sorted tumors

| FCS Filename          | Parameter | Marker | % of Gated Cells |
|-----------------------|-----------|--------|------------------|
| un2-neg-cont.007      | FL1-H     | None   | 100.0            |
| un2-neg-cont.007      | FL4-H     | I      | 0.18             |
| un2-647-cont.008      | FL1-H     | None   | 100.0            |
| un2-647-cont.008      | FL4-H     | I      | 3.32             |
| N(+)-1_Ncad-cd44.001  | FL1-H     | None   | 100.0            |
| N(+)-1_Ncad-cd44.001  | FL4-H     | I      | 41.72            |
| N(+)-2_Ncad-cd44.002  | FL4-H     | None   | 100.0            |
| N(+)-2_Ncad-cd44.002  | FL4-H     | I      | 40.78            |
| N(-)-1_Ncad-cd44.005  | FL4-H     | None   | 100.0            |
| N(-)-1_Ncad-cd44.005  | FL4-H     | I      | 8.7              |
| N(-)-2_Ncad-cd44.006  | FL4-H     | None   | 100.0            |
| N(-)-2_Ncad-cd44.006  | FL4-H     | I      | 8.46             |
| N(un)-1_Ncad-cd44.003 | FL4-H     | None   | 100.0            |
| N(un)-1_Ncad-cd44.003 | FL4-H     | I      | 10.77            |
| N(un)-2_Ncad-cd44.004 | FL4-H     | None   | 100.0            |
| N(un)-2_Ncad-cd44.004 | FL4-H     | I      | 9.67             |

|              | Ave%   |
|--------------|--------|
| Ncad(+)-sort | 41.25% |
| Ncad(-)-sort | 8.58%  |
| Ncad unsort  | 9.95%  |

FIG. 3

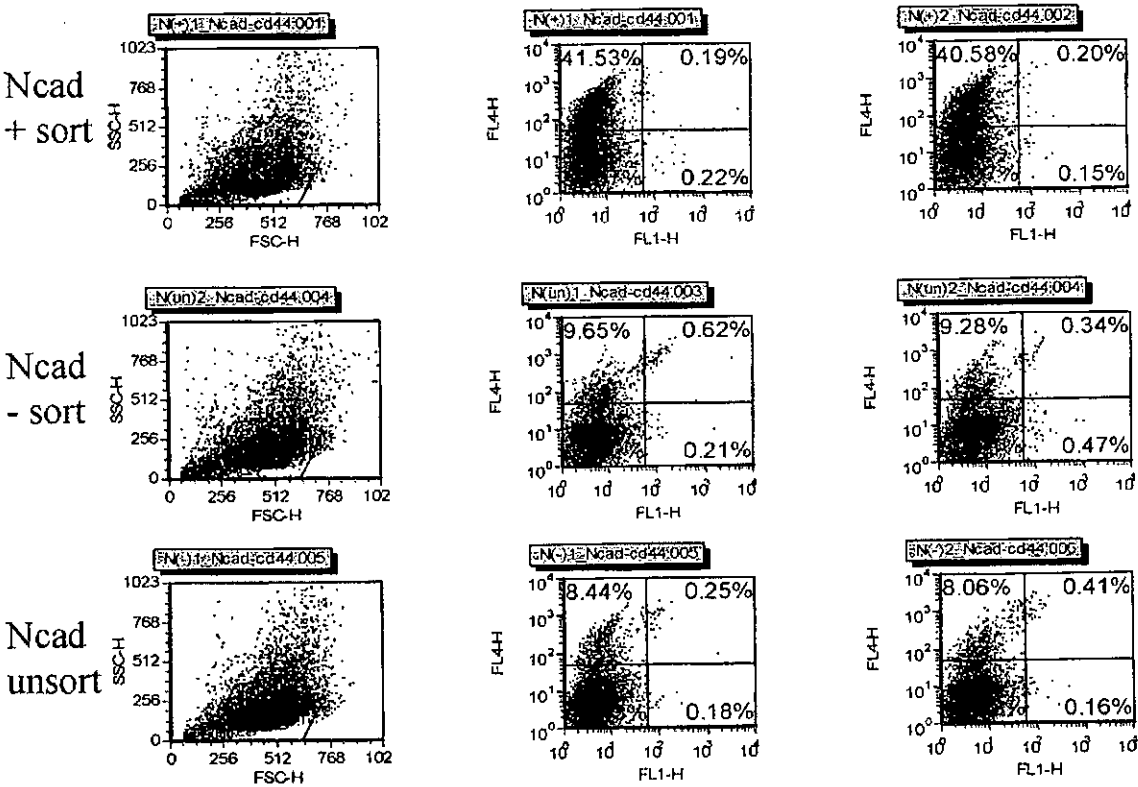


FIG. 4

Model of N-cadherin signaling in prostate cancer

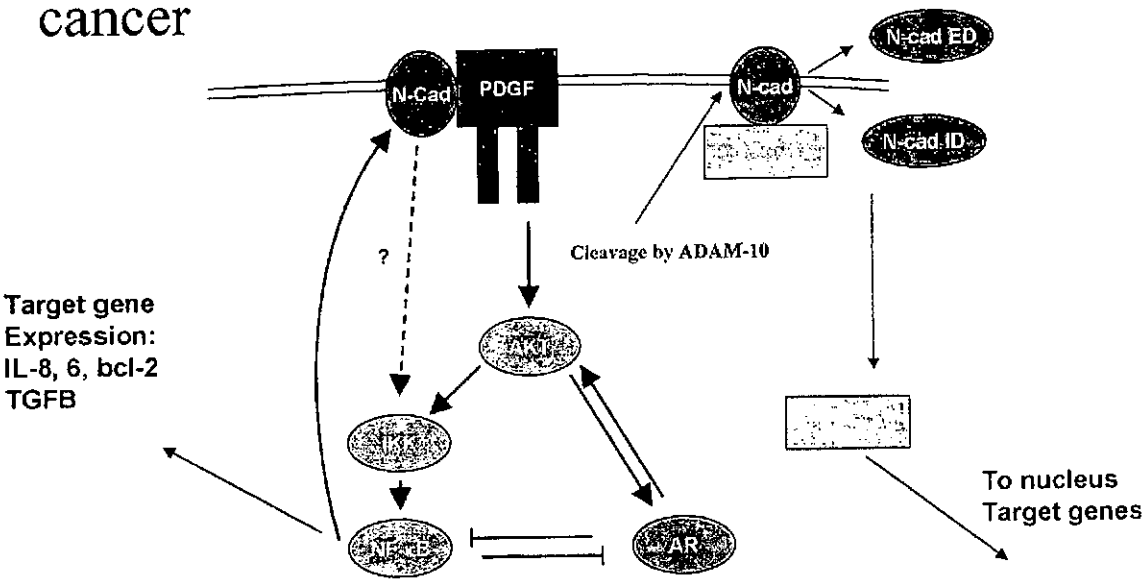
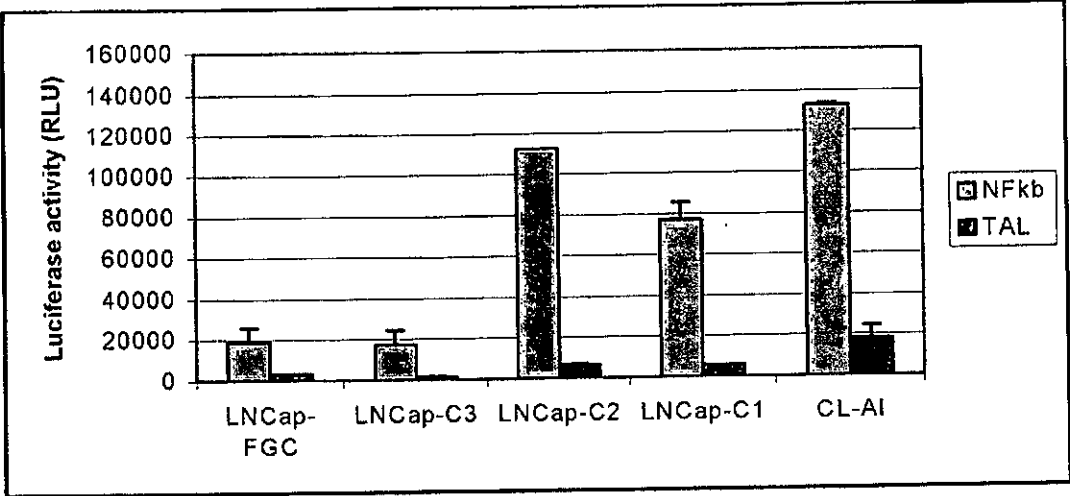


FIG. 5

# N-cadherin Activates NF-κB



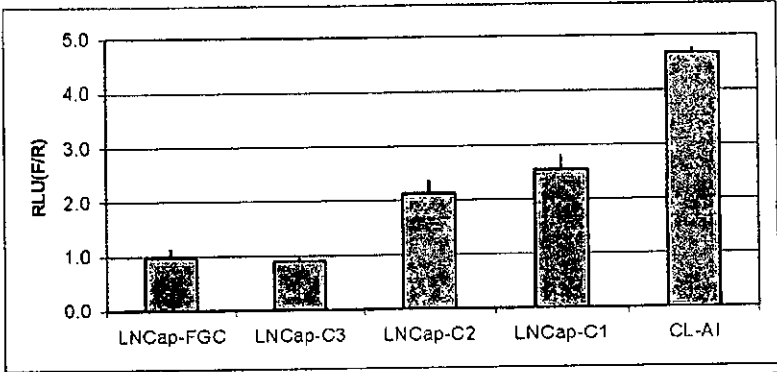
Normal serum

NF kappa B reporter assay: TAL is negative control

FIG. 6

# N-cadherin Activates NF-κB

Normal serum



DCC serum  
Androgen depleted

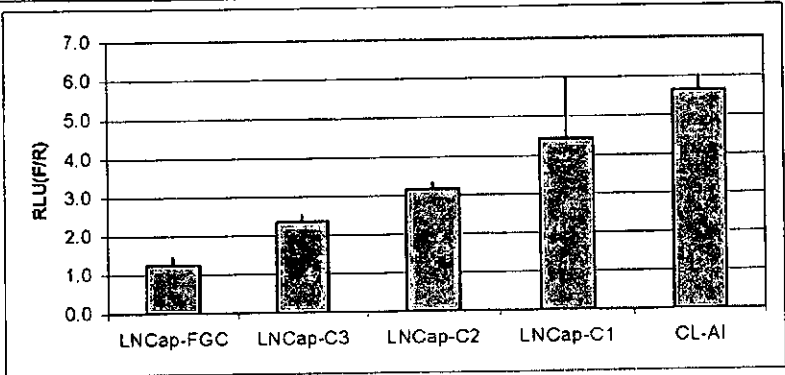
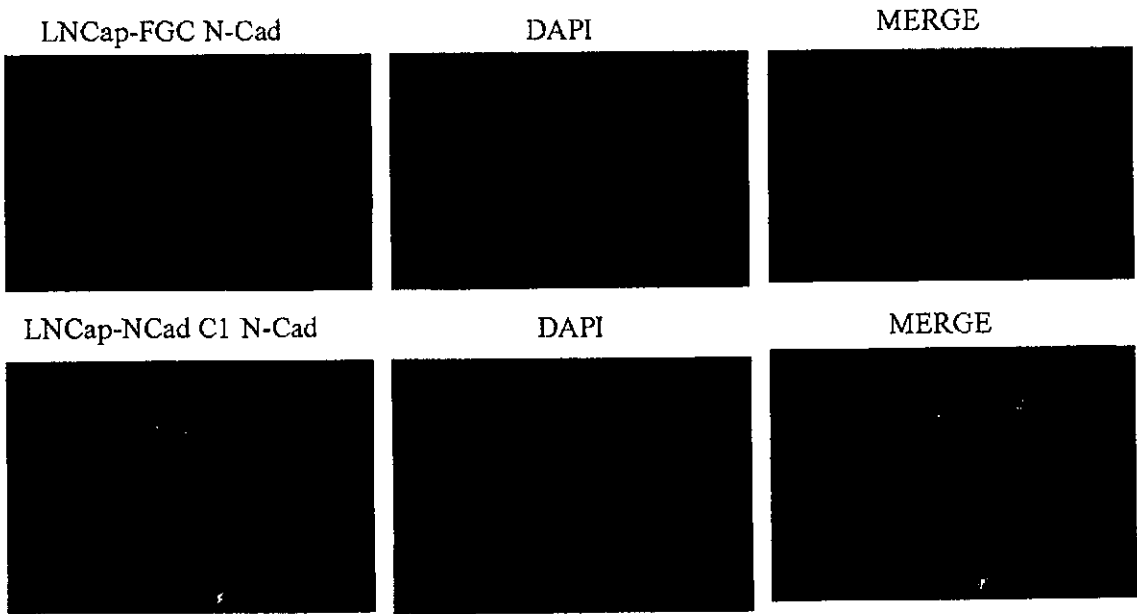


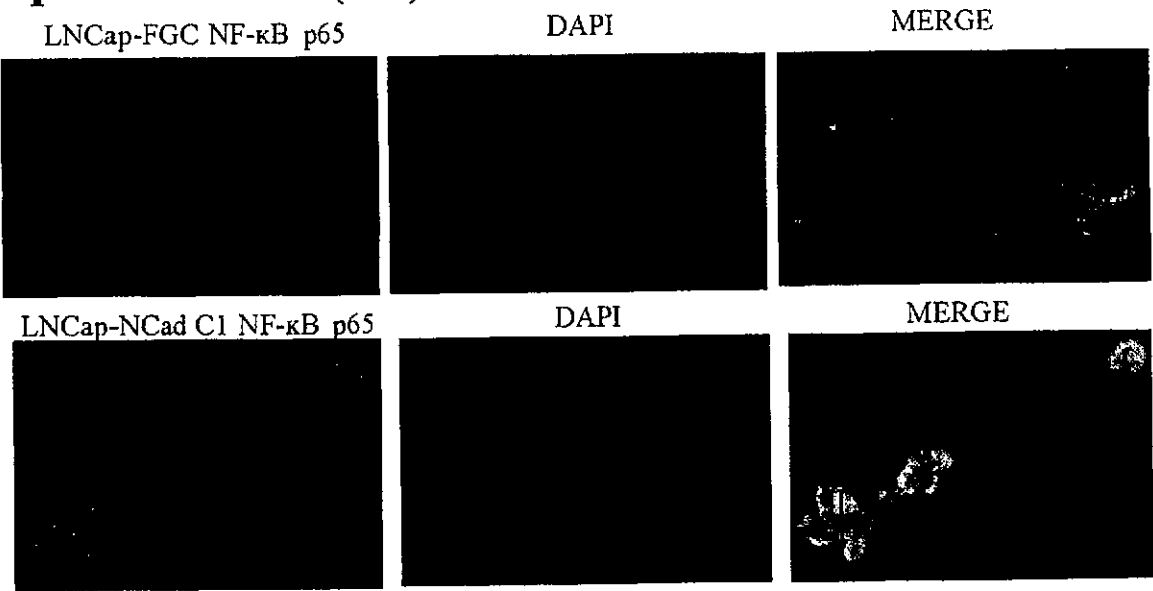
FIG. 7

**N-cadherin is expressed on cell surface of C1 cells**



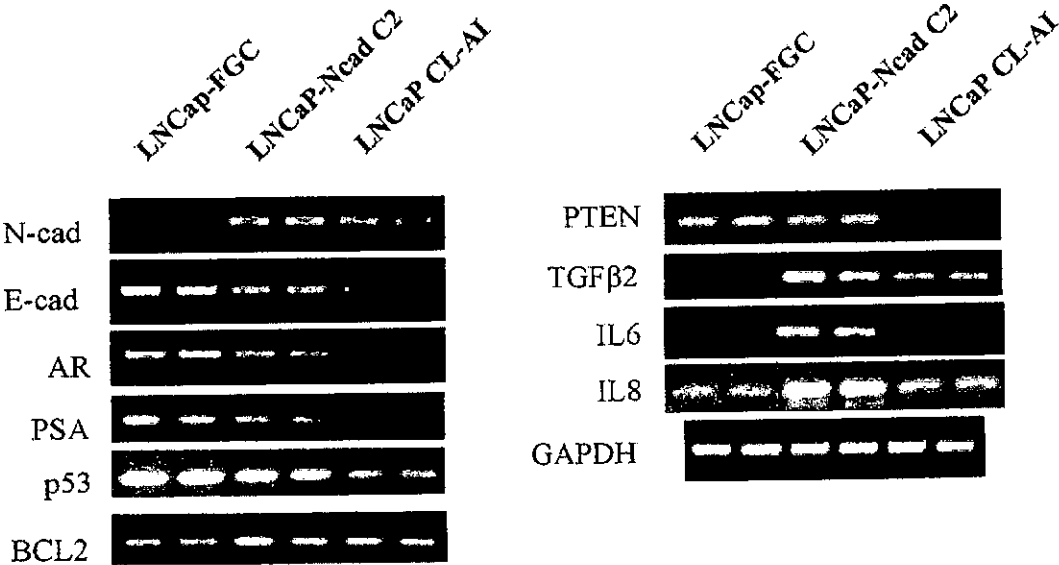
**FIG. 8**

**NF-κB localizes to nucleus in N-Cadherin positive cells (C1)**



**FIG. 9**

**N-Cadherin Expression Results in Induction of IL-6, IL-8, TGF  $\beta$  2, and bcl-2**



**FIG. 10**

6A

Correlation of Induced Genes with N-Cadherin Level

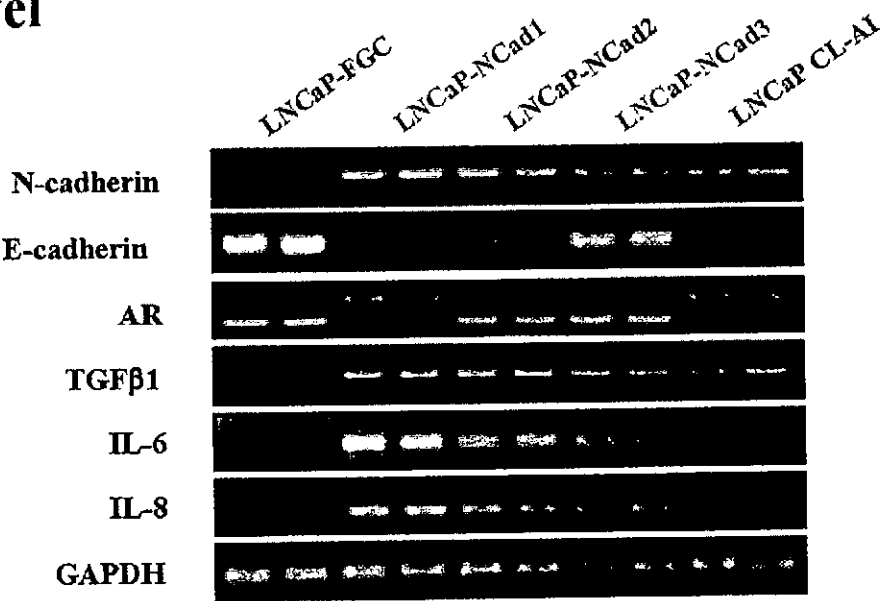


FIG. 11

12/16

# N-Cadherin Knockdown Leads to Downregulation of IL-6 and IL-8

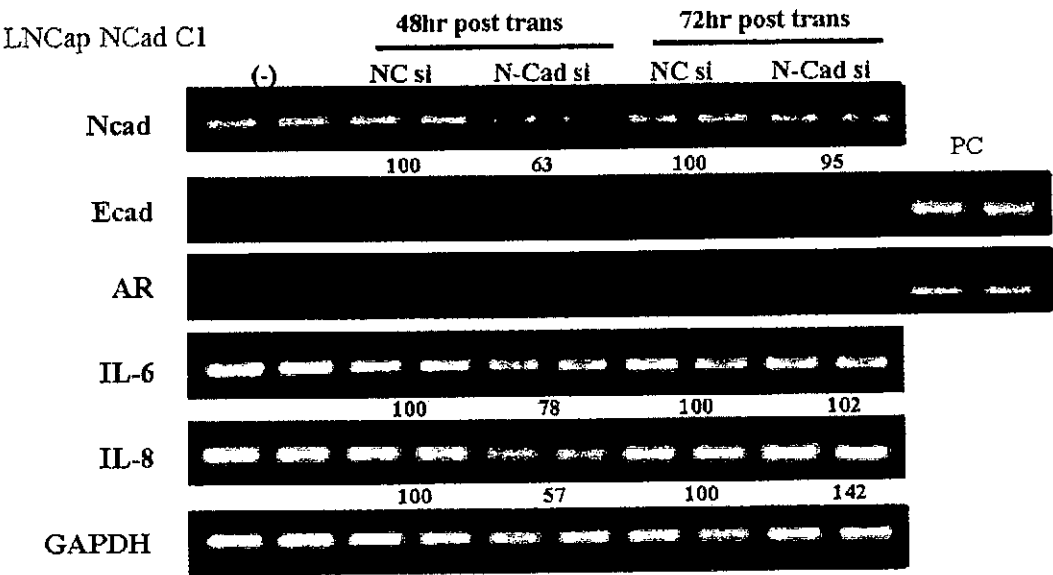
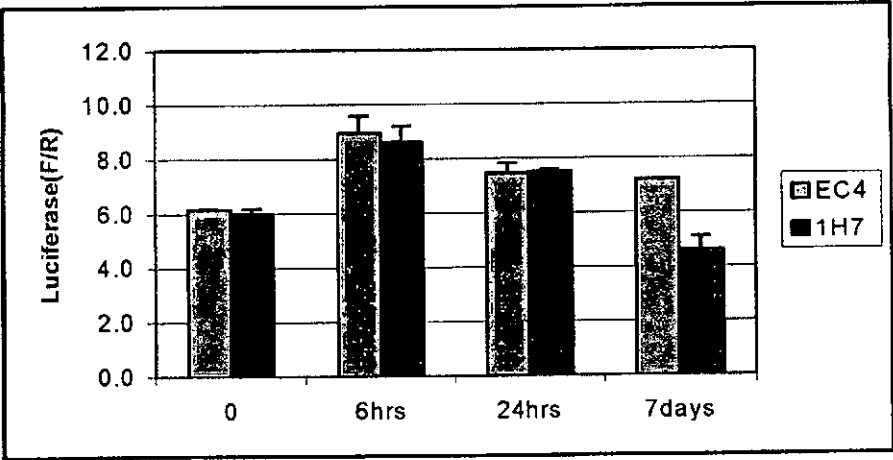


FIG. 12

**NFkB activity after N-Cadherin antibodies treatment**



NFkB activity after 7days treatment of 1H7, reduced slightly.  
This is in agreement with the western blot where pAkt and Ncad expression was reduced.

**FIG. 13**

Ncad in PC3 cells: 48hr antibody incubation  
(From previous) (with fibronectin)

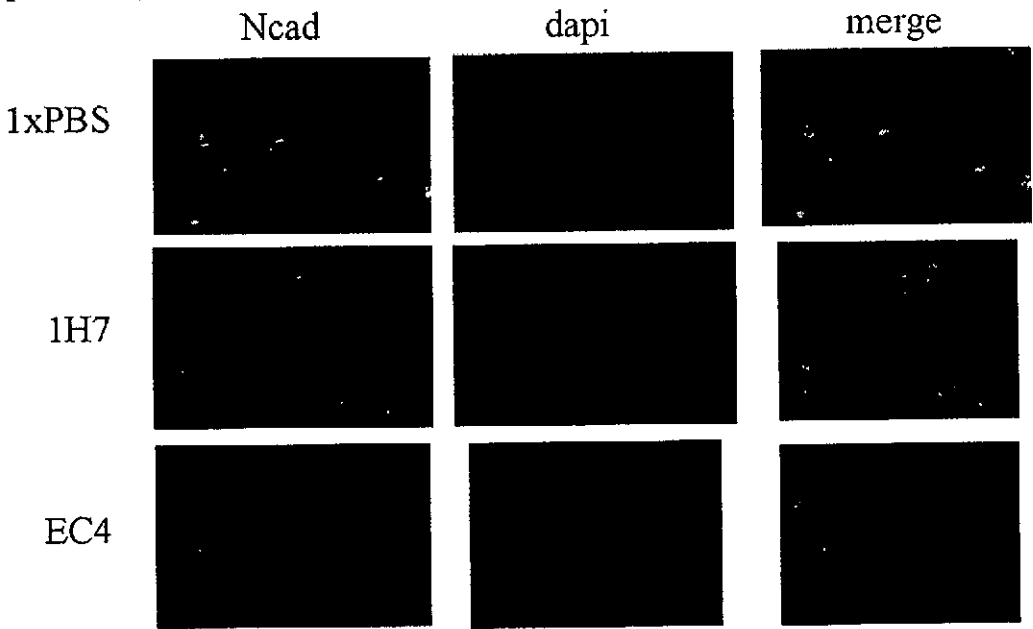


FIG. 14

N-Cadherin Knockdown Leads to Downregulation Of Activated Akt

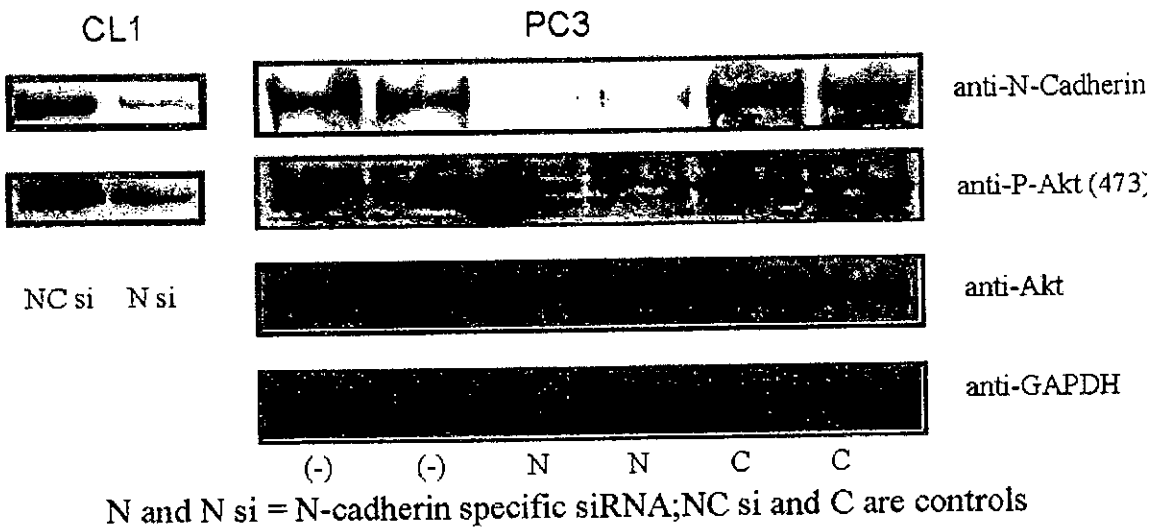


FIG. 15

N-cadherin specific antibodies activate, then downregulate Akt activation

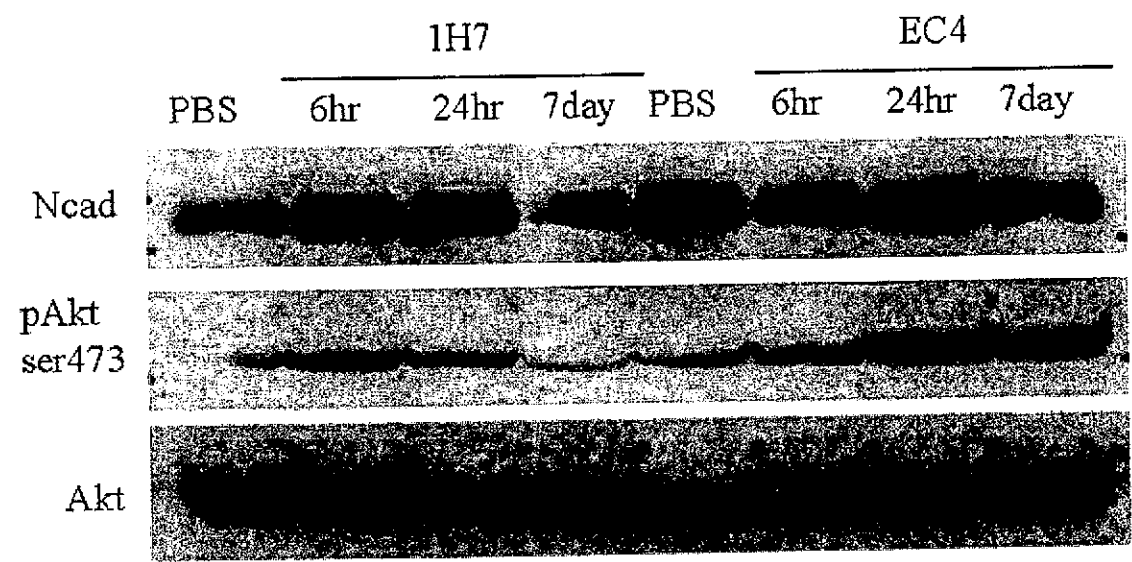


FIG. 16

(25) Idioma de presentación: inglés

(26) Idioma de publicación: inglés

(30) Fecha de la prioridad:

61/113.042      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) Inventores; y

(75) Inventores / solicitantes (sólo para los Estados Unidos): REITER, Robert, E. [US/US]; 10511 Kinnard Avenue, Los Ángeles, California 90024-6017 (US). LEPIN, Eric [US/US]; 700 Westwood Plaza, Los Ángeles, California 90095 (US); WU, Anna, M. [US/US]; 14919 Sutton Street, Sherman Oaks, California 91043 (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, HIJ, IE, IS, if, 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))

(88) Fecha de la publicación del informe de búsqueda internacional: 16 de septiembre de 2010

(48) Fecha de publicación de esta versión correiga:  
3 de febrero de 2011

(15) Información sobre la corrección:  
ver nota del 3 de febrero de 2011

(54) Titulo: ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA N-CADHERINA

El knockdown de N-cadherina conduce a una regulación hacia abajo de Akt activado

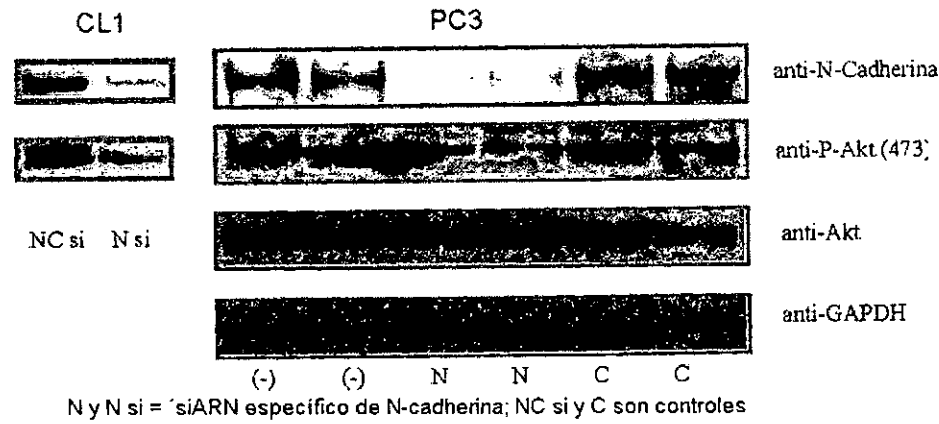


FIG. 15

ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA N-CADHERINA

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º EE.UU. 61/113.042, presentada el 10 de noviembre de 2008, que se incorpora en la presente a título de referencia.

DECLARACIÓN EN CUANTO A LOS DERECHOS A LAS INVENCIONES HECHAS BAJO INVESTIGACIONES O DESARROLLOS PATROCINADOS FEDERALMENTE.

[0002] NIH/NCI SOMI Training Grant, R25 CA 098010, M. Phelps/A. Wu, Directores

NIH/NCI UCLA Prostate SPOR, P50 CA 092131, R. Reiter/A. Wu. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

REFERENCIA A "LISTADO DE SECUENCIAS", UNA TABLA, O UN APÉNDICE CON UN LISTADO DE PROGRAMA DE COMPUTADORA PRESENTADOS EN UN DISCO COMPACTO

[0003] NO CORRESPONDE

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] 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 (Punghia 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)).

[0005] Los estudios de perfilado recientes sugieren que las firmas 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.

[0006] A efectos de identificar nuevos candidatos a marcadores de sueros o tejidos de cáncer de próstata refractario a las hormonas, hemos comparado previamente perfiles de expresión de genes de xenoinjertos apareados de cáncer de próstata dependientes e independientes de hormonas. Se estableció el

xenoinjerto LAPC-9 a partir de una metástasis osteoblástica de hueso y de sus progresos desde dependencia de hormonas andrógenas a independencia de drogas andrógenas después de castración en ratones inmuno deficientes (Craft et al., *Cáncer Research*, In Press (1999)). Esto se ha utilizado anteriormente para identificar candidatos a agentes terapéuticos en cáncer de próstata. Se validaron genes expresados diferencialmente y seguidamente se los examinó para establecer la homología de las secuencias en cuanto a proteínas secretadas o proteínas de las superficies de las células. Se ha identificado la N-cadherina como marcador de cáncer. Se ha informado anteriormente acerca de la identificación, caracterización y validación inicial de la N-cadherina, que se expresa tanto en el cáncer de próstata como en el cáncer de vejiga refractario a las hormonas (documento WO/2007/109347).

**[0007]** Un tipo de movimiento de células que puede observarse en la embriogénesis requiere la pérdida de los contactos entre células para la migración de las células individuales o de pequeños grupos de células a través de la matriz extracelular. Este proceso recibe la denominación de EMT (mesenchymal transition, transición mesenquimal). El EMT se presenta también en situaciones patológicas, tales como la adquisición de un fenotipo motil e invasivo de células tumorales de origen epitelial. Una de las características del EMT es la pérdida de

E-cadherina y la expresión de novo de las moléculas de adhesión de la N-cadherina. La N-cadherina promueve la supervivencia de las células del tumor, su migración e invasión, y los elevados niveles de N-cadherina se asocian frecuentemente con un pobre pronóstico. La N-cadherina se expresa también en las células endoteliales y desempeña un rol esencial en la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos normales y de los vasos sanguíneos angiogénicos asociados con tumores. La creciente evidencia experimental sugiere que la N-cadherina es un potencial agente terapéutico para el tratamiento del cáncer.

[0008] La función de la N-cadherina ha sido estudiada a nivel molecular. La región extracelular N-terminal N-cadherina (160 a 724 a.a) consiste en 5 dominios (ECD1-ECD5). El ECD1 y ECD2 son los dominios mínimos requeridos para la adhesión intracelular, pero si interviene la totalidad de los dominios extracelulares, se refuerza el nivel de adhesión. Además, un estudio ha demostrado que una porción de 69 aminoácidos de ECD4 es esencial para la migración y movilidad pero no en la adhesión celular (Kimet al. *J célula Biol* 2000).

[0009] Por lo tanto, la invención provee composiciones y métodos que apuntan a la N-cadherina en el diagnóstico y tratamiento de cánceres que expresan que incluyen a título no limitante el cáncer de próstata y el cáncer de vejiga. En la presente también se informa sobre anticuerpos y fragmentos de

ellos, que son específicos para los dominios extracelulares de la N-cadherina.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0010] La presente solicitud provee anticuerpos completamente humanos contra la N-cadherina para métodos terapéuticos y de diagnóstico en cáncer, por ejemplo cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0011] **Figura 1.** Enriquecimiento en anticuerpo fago anti-N-cadherina mediante sucesivas recorridos de paneo.

[0012] **Figura 2.** Teñidos de diacuerpo A14, C7, E4 y D4 de células PC3.

[0013] **Figura 3.** Ligazón de diacuerpo C7 a células negativas a N-cadherina.

[0014] **Figura 4.** Ligazón específica de diacuerpos E4 y D4 a células que expresan N-cadherina.

[0015] **Figura 5.** Localización de tumores o localización de D4 Db etiquetado con <sup>124</sup>I en tumores LAPC9 AI.

[0016] **Figura 6.** La N-cadherina activa el NF-KB.

[0017] **Figura 7.** La N-cadherina activa el NF-KB.

[0018] **Figura 8.** La N-cadherina se expresa sobre la superficie celular de las células C1.

[0019] **Figura 9.** El NF-KB se localiza en el núcleo de células positivas a N-Cadherina (C1).

[0020] **Figura 10.** La expresión de N-cadherina tiene como resultado la inducción de IL-6, IL-8, TGF  $\beta$ 2, y bcl-2.

[0021] **Figura 11.** Correlación de genes inducidos con el nivel de N-cadherina.

[0022] **Figura 12.** El knockdown de la N-cadherina conduce a la regulación descendente de IL-6 y IL-8.

[0023] **Figura 13.** Actividad de NF-KB después del tratamiento con anticuerpos de N-cadherina.

[0024] **Figura 14.** Ncad en células PC3: incubación de anticuerpos durante 48 horas.

[0025] **Figura 15.** El knockdown de la N-cadherina conduce a la regulación descendente de Akt activado.

[0026] **Figura 16.** Los anticuerpos específicos con respecto a la N-cadherina activan y seguidamente regulan descendentemente la activación del Akt.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0027] Aquí informamos acerca del método para tratar un paciente de cáncer y acerca del método para identificar células madre de cáncer, en los que la proteína N-cadherina en las células de cáncer se expresa en niveles normales o bajos, o se expresa mediante un subconjunto de células de cáncer y no está sobre expresado. Además de ello, en la presente informamos acerca de anticuerpos, y sobre fragmentos de ellos, que son específicos con respecto a los dominios extracelulares de la N-cadherina.

[0028] La expresión de la N-cadherina puede contribuir a la invasión y metástasis de cáncer de vejiga así como a la progresión de la enfermedad refractaria a las hormonas. Es posible apuntar a la N-cadherina terapéuticamente tanto sola como en combinación con otros inhibidores de molécula pequeña de mTOR y EGFR. El apuntar a la N-cadherina puede ayudar a prevenir o a controlar el cáncer de próstata invasivo y metastásico.

[0029] Esta invención se refiere al descubrimiento de que no es necesario que la N-cadherina esté sobre expresada a diferencia de los tejidos normales para ser un objetivo para el tratamiento y diagnóstico. Puede expresarse con bajos niveles y

también puede expresarse solamente mediante un subconjunto de células. Hemos descubierto que el apuntar a la N-cadherina aún en el 5 % de las células de cáncer de próstata es suficiente para bloquear la progresión del cáncer de próstata con respecto a la resistencia a la castración.

[0030] Esta invención también se relaciona con la N-cadherina como un objetivo en las células madre de cáncer. Hemos descubierto que el apuntar a la N-cadherina en 5 % o menos de las células es suficiente para bloquear la progresión del tumor. Este descubrimiento 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.

[0031] Esta invención se refiere también al descubrimiento de que 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.

[0032] Por lo tanto, la N-cadherina es un objetivo terapéutico especialmente prometedor. Se la encuentra sobre las superficies de las células, expresada en muchos tumores epiteliales, y está asociada con la invasión, metástasis y posiblemente independencia con respecto a las hormonas andrógenas. Por ello los anticuerpos contra la N-cadherina son un agente particularmente preferido para su uso en el tratamiento de cánceres epiteliales, los que incluyen pero no a título de limitación, los cánceres 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, de los dominios primero a tercero, 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.

**[0033]** Aquí describimos la selección y caracterización de ScFvs humanos que son específicos con respecto a dos proteínas recombinantes N-cadherina independientes: los dominios extracelulares N-cadherina uno a tres (ECD1-3) y el cuarto dominio N-cadherina (ECD4). Se diseñaron las dos detecciones selectivas correspondientes en un esfuerzo por generar reactivos capaces de influir sobre el fenotipo de adhesión y migración de esta molécula así como para generar reactivos para apuntar a las células que expresan N-cadherina. Los clones de fago individuales tomados de la cuarta corrida de paneo fueron caracterizados mediante ELISA y citometría de flujo. Los ligantes específicos fueron secuenciados, y algunos de los clones seleccionados fueron reformateados en forma de pequeños fragmentos de anticuerpo bivalentes (diacuerpos). Los diacuerpos muestran una ligación específica con respecto a las células que expresan N-cadherina.

**[0034]** Los fragmentos anti-N-cadherina, descritos en la presente, son el bloque constructivo o ladrillo básico sobre el cual es posible fabricar anticuerpos humanos enteros o anticuerpos diseñados de diversos tamaños y formas, siendo el atributo primario de ellos su capacidad de ligarse específicamente a la proteína N-cadherina. Estos anticuerpos

pueden utilizarse para el tratamiento o diagnóstico de cáncer de próstata, vejiga u otros cánceres que expresan la proteína N-cadherina. Es importante destacar que la expresión de la N-cadherina en el tumor puede ser por las células como tales o mediante cualquiera de los estromas rodeantes (músculos, fibroblastos, vasos sanguíneos, etc.). Hemos mostrado previamente que la N-cadherina es un importante determinante biológico de la invasión, desarrollo, metástasis y progresión de los cánceres de próstata, de vejiga y otros, y que es un agente terapéutico crítico para el diagnóstico, pronóstico y terapia. Los anticuerpos monoclonales murinos contra la N-cadherina tienen la capacidad de bloquear el desarrollo de los tumores, su metástasis, invasión y progresión hacia la independencia con respecto a las hormonas andrógenas en los modelos animales de cáncer. El descubrimiento de scFV humanos que pueden reformatearse fácilmente en anticuerpos enteros o diseñados provee la capacidad de apuntar a cánceres sin incitar una inmunorrespuesta contra los anticuerpos.

**[0035]** De acuerdo con nuestro conocimiento, estamos describiendo los primeros fragmentos de anticuerpos contra N-cadherina derivados con la finalidad de diagnóstico y tratamiento de cáncer de próstata y de otros cánceres. La invención se basa en la técnica anterior desarrollada por nuestro grupo que implica la N-cadherina en la progresión del

cáncer de próstata y de vejiga, y de otros cánceres, así como el concepto de apuntar a la misma con fines terapéuticos. La visualización de los fagos describe una técnica bien establecida para la aislación de fragmentos de anticuerpos. La biblioteca de fagos no inmunes utilizada en la presente ha sido desarrollada por el Dr. JD Marks en UC. San Francisco.

[0036] La invención describe la aislación y caracterización de fragmentos monocatenarios que reconocen la N-cadherina. Los mismos pueden utilizarse como fragmentos monocatenarios o reformatearse en forma de fragmentos más grandes, tales como IgG entero, que pueden utilizarse para el diagnóstico o tratamiento de cánceres.

[0037] Como se mencionó, la invención describe una cantidad de fragmentos candidato con una posible utilidad para diagnóstico y terapia que pueden ser reformateados en forma de constructos más grandes y utilizarse para reconocer N-cadherina en cáncer de próstata y otros cánceres. Estos anticuerpos pueden utilizarse tal cual (anticuerpos desnudos) o pueden ser conjugados a radioisótopos, nanopartículas, liposomas, virus o cualquier otra "carga útil" para su entrega a tumores para fines de terapia, formación de imágenes u otra finalidad. Pueden utilizarse los fragmentos para incrementar el carácter específico de cualquier modalidad de formación de imágenes para tumores que expresan N-cadherina.

[0038] Hasta donde sabemos, somos los primeros en demostrar que los anticuerpos contra N-cadherina tienen una actividad terapéutica, superior a la de cualquier otro medio conocido para apuntar a tales tumores. La ventaja de la invención es que los fragmentos de anticuerpo son inmunógenos y humanos y pueden utilizarse en pacientes sin una modificación adicional. Por otra parte, los fragmentos que reconocen N-cadherina tienen la ventaja de su flexibilidad, ya que es fácil diseñarlos para prácticamente cualquier finalidad.

#### Definiciones

[0039] Las expresiones "N-cadherina" y "E-cadherina" se refieren 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 7, 8, y 9, 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 7, 8, y 9, 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 7, 8, y 9, 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 7, 8, y 9. 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.

[0040] 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.

[0041] El cáncer a ser tratado en la presente puede ser uno caracterizado por una excesiva activación de N-cadherina. Como alternativa, el cáncer a ser tratado en la presente puede ser uno en el que la proteína N-cadherina se expresa con niveles normales o bajos, o uno en el que la proteína N-cadherina está expresada por un subconjunto de células, y donde la proteína N-cadherina no está sobreexpresada. 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 de N-cadherina. Se consideran diversos ensayos para determinar dicha amplificación/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 a ser tratado no es todavía invasivo, pero expresa N-cadherina.

**[0042]** 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.

**[0043]** La expresión "sobreeexpresión" se refiere a una expresión de ARN o de proteína de N-cadherina, LY6-E, y de E-cadherina en una muestra de tejido de prueba que es significativamente más

elevada que la expresión de ARN o de proteína de N-cadherina, LY6-E, y E-cadherina, respectivamente, en una muestra de tejido de control. En una forma de realización, la muestra de tejido es autóloga. Las muestras de tejido de prueba canceroso (por ejemplo, vejiga, próstata) asociadas con el grado de invasión, metástasis independiente con respecto a las hormonas (por ejemplo independiente con respecto a las hormonas andrógenas) o el grado refractario frente a un tratamiento o con una mayor probabilidad de llegar a ser refractario, típicamente tienen una expresión de proteína N-cadherina o LY6-E que es por lo menos el doble, frecuentemente una expresión de N-cadherina o de LY6-E de hasta tres, cuatro, cinco, ocho o diez veces, en comparación con tejidos de cáncer tomados de pacientes que tienen una menor probabilidad de evolucionar hacia una metástasis o con respecto a muestras de tejido normales (es decir, que no tienen cáncer). Tales diferencias pueden ser fácilmente evidentes cuando se examinan las bandas de geles con una carga aproximadamente igual de muestras de prueba y muestras de control. Los cánceres de próstata que expresen cantidades incrementadas de N-cadherina o de Ly6-E tienen más probabilidades de llegar a ser invasivas, formar metástasis o de evolucionar en formas de cáncer independientes de las hormonas andrógenas o refractarias al tratamiento. Hay varios cortes pertinentes para el carácter positivo frente a N-

cadherina o Ly6-E, ya que es posible que un pequeño porcentaje de células positivas frente a N-cadherina o Ly6-E en tumores primarios permitan identificar tumores con un elevado riesgo de recurrencia y metástasis. Los términos "sobreexpresa", "sobreexpresión" o "sobreexpresado" se refieren de manera intercambiable a un gen que se transcribe o traduce en un nivel detectablemente más elevado, usualmente en una célula de cáncer, en comparación con una célula normal. Por ello la sobreexpresión se refiere tanto a la sobreexpresión de proteína como de ARN (debido a la transcripción incrementada, procesamiento transcripcional, traducción, procesamiento post traducción, estabilidad alterada, y degradación de la proteína alterada), así como la sobreexpresión local debida a los patrones alterados del tráfico de proteínas (mayor localización nuclear), y una mayor actividad funcional, por ejemplo, como en una hidrólisis enzimática incrementada del substrato. La sobreexpresión también puede ser del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con una célula normal o con una célula de comparación (por ejemplo, una célula de BPH).

[0044] 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.

[0045] 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 expresa o estabiliza con una degradación mínima en una célula de cáncer en comparación con una célula normal, por ejemplo, una expresión del doble, una expresión 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.

[0046] A la inversa, típicamente la E-cadherina se subexpresa en muestras de tejidos cancerosos en muestras de tejidos tomados de pacientes de cáncer de los cuales es probable que se hagan invasivos, hagan metástasis o evolucionen en forma de un cáncer independiente a los andrógenos o refractarios al tratamiento. Esta subexpresión puede ser del doble, del triple, del cuádruplo, o de por lo menos el quintuplo. Tales diferencias pueden ser fácilmente evidentes cuando se observan las bandas de geles con cargas aproximadamente iguales de muestras de prueba y de control. Los valores combinados de N-cadherina/E-cadherina en cánceres de los que es probable que se harán invasivos, formen metástasis o evolucionen en forma de un cáncer independiente de las hormonas andrógenas o refractarios al tratamiento, son por ello aun más grandes y pueden ser de por lo menos el doble, triple, cuádruple, décuplo o de veinte veces más grandes. Hay varios cortes pertinentes para el carácter positivo de la N-cadherina /carácter negativo de la E-cadherina, por cuanto es posible que un pequeño porcentaje de células positivas a la N-cadherina en los tumores primarios

permitan identificar tumores con un elevado riesgo de recurrencia y metástasis.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] Las expresiones "activadoras" y "moduladoras" 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.

[0050] 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).

**[0051]** 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.

**[0052]** 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.

[0053] 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, o 30 nucleótidos de longitud.

[0054] 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 (por ejemplo, véase la Figura 5) 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 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

**[0055]** 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.

**[0056]** 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.

[0057] 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.

[0058] 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 quinasa, 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  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular); la identificación de la expresión de genes corriente abajo o de genes informantes (CAT, luciferasa,  $\beta$ -gal, GFP y similares), por ejemplo, mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, ligación de anticuerpos, marcadores inducibles, y ensayos de ligación de ligandos.

[0059] 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%.

[0060] 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.

[0061] 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.

[0062] 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.

**[0063]** 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.

[0064] 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)).

[0065] 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 (1997) 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

112

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.

**[0066]** 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).

**[0067]** 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 (Batzer 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.

[0068] 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).

[0069] 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.

[0070] 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,  $\gamma$ -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  $\alpha$  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.

[0071] 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.

[0072] 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.

**[0073]** 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.

**[0074]** 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)).

**[0075]** Una "etiqueta" o "parte detectable" es una composición que es detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicas, u otros medios físicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen  $^{32}\text{P}$ , 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.

**[0076]** 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.

**[0077]** 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).

[0078] 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.

[0079] 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.

[0080] 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.).

[0081] 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.

[0082] Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetramero. Cada tetramero 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.

[0083] 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)).

[0084] 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, Kubly, *Immunology* (3<sup>rd</sup> 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).

[0085] 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.

[0086] 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.

[0087] 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 pro fármaco en un agente citotóxico.

[0088] El inmunoconjugado puede ser utilizado para apuntar la parte efectora hacia una célula positiva frente a la N-cadherina, particularmente células que expresan la N-cadherina o la proteína Ly6. 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, doxorubicina, daunorubicina, 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.

[0089] 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 no se limitan a, GC4, 1H7, 1F12, 2B3.

**[0090]** 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.

[0091] Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas (Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal 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)).

[0092] 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.

[0093] 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)).

[0094] 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.

[0095] 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.

[0096] 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.

[0097] 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.

[0098] 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.

[0099] 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.

La E-cadherina es una proteína de la superficie de las células que interviene en la adhesión entre células epiteliales y células y que se pierde comúnmente en los tumores sólidos invasivos y metastásicos.

### Formas de realización detalladas

[0100] La presente invención provee métodos para tratar un paciente de cáncer. En términos generales los métodos comprenden los pasos siguientes: (a) obtener una muestra de tejido de prueba tomado 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 proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba en comparación con una muestra de tejido de control tomado de un individuo del que se sabe que es negativo para el cáncer; con ello diagnosticar dicho cáncer que expresa una proteína N-cadherina, donde la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos, o está expresada por un subconjunto de células y no está sobreexpresada; y (c) administrar una cantidad efectiva de anticuerpo de N-cadherina al individuo que está en riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina. 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 transcripto 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.

[0101] En otra forma de realización, los métodos de detección pueden llevarse a cabo poniendo en contacto una muestra de tejido de prueba tomada de un paciente que expresa una proteína N-cadherina o un transcrito de mRNA con un primer conjunto de un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido cada uno de los cuales se hibrida de manera específica a 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.

**[0102]** Los métodos encuentran una aplicación particular en 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.

**[0103]** En términos generales el tratamiento implicará la administración repetida de los anticuerpos anti-N-cadherina 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 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.

[0104] 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 antígenéticas significativos.

[0105] En algunas formas de realización, la invención provee un método para tratar el cáncer, en particular un cáncer que expresa N-cadherina, o para inhibir el desarrollo de una célula de cáncer que expresa una proteína N-cadherina mediante el tratamiento de un sujeto o poniendo en contacto la célula de cáncer con un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce y se liga a la proteína N-cadherina en una cantidad que es efectiva para inhibir el desarrollo de la célula de cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer de célula es un cáncer de células de próstata o un cáncer de células de vejiga. El anticuerpo de puesta en 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 un Fab, F(ab)<sub>2</sub>, o Fv. En otras formas de realización, el fragmento comprende una proteína recombinante que tiene una región de ligación con antígeno.

[0106] En cualquiera de las formas de realización arriba descritas, es además posible administrar un fármaco quimioterapéutico y/o una terapia de radiación. En algunas formas de realización, el paciente recibe también una terapia antagonista de hormonas. La puesta en contacto del paciente con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede efectuarse administrando el anticuerpo al paciente por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral o intradérmica. En algunas formas de realización, el paciente tiene un cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de próstata). En algunas formas de realización de las precedentes, el paciente adolece de cáncer de próstata y el paciente recibe además de manera óptima una terapia de ablación de hormonas. En algunas formas de realización, la puesta en contacto comprende administrar el anticuerpo directamente en el cáncer o en una metástasis del cáncer.

[0107] En algunas formas de realización, la invención provee un método para tratar un paciente de cáncer. En términos generales el método comprende (a) obtener una muestra de tejido de prueba tomada de un individuo con el 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 prueba por comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; con ello diagnosticar el cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en la que la proteína N-cadherina se expresa en niveles normales o bajos, o está expresada por un subconjunto de células y no está sobreexpresada; (c) determinar si es probable que un cáncer llegue a ser invasivo, haga metástasis, se haga independiente de las hormonas, o se haga refractario al tratamiento; (d) administrar un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, terapia hormonal o radioterapia de acuerdo con si hay una mayor probabilidad de que el cáncer se haga invasivo, haga metástasis, se vuelva independiente de las hormonas o se haga refractario al tratamiento.

[0108] En algunas formas de realización, es posible seleccionar el agente quimioterapéutico entre el grupo consistente en ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina de difteria, toxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina mitogelina, retstrictocina, fenomicina,

enomiocina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de saponaria officinalis, maitansinoides y glucocorticoidricina.

**[0109]** Por otra parte la invención provee métodos para identificar células madre de cáncer. En términos generales, los métodos comprenden (a) obtener una muestra de tejido de prueba tomada de un individuo con el riesgo de tener un cáncer que expresa una proteína N-cadherina; (b) determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra de tejido de prueba por comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; en la que la proteína N-cadherina se expresa con niveles normales o bajos, o se expresa mediante un subconjunto de las células vástago y no está sobreexpresada.

**[0110]** En algunas formas de realización, la invención comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo capaz de ligarse al dominio extracelular 4 de la N-cadherina, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEQ ID NO: 1:

MAQVQLVQSGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMIWVRQAPGKGLEWVSSISGSSDSTSYA  
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKATGYSYYYGMDVWGP GTTVTVSSGGG  
GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYGA  
TTLQHGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYFCQQAHSPPTFGGGTKLEIKR

[0111] En algunas formas de realización, la invención comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo capaz de ligarse a los dominios extracelulares 1-3 de la N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre los siguientes grupos:

SEQ ID NO 2:

MAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSYIHWVRQAPGQGFWMGIINPSGGSASYA  
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEIRSLR

SEQ ID NO 3:

MAQVQLQESGWYFDLWGRGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLASVGDRTIT  
CRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
YYCLQDYNQWTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO 4:

MAQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFSSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGRVKSYA  
DAVKGRFTISRDNSENILYVQIDSLRVEDTAVYYCARRGGDHAAGMDVWGQGTITVTVSSGGGG  
SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGGRSDIGGYNVSWYQQHPGKAPKLMID  
VGNRPSGVSNRFSKSGNT

SEQ ID NO 5:

MAPGAAGGVGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTXVYYCARLEYSSSSRAFDVWGQGTITVTVSSGGG  
GSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNN  
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO 6: MAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF

SEQ ID NO 7:

MAQVQLVQSGAEVKRPGASVRISCKASGYPFTTYPIHWVRQAPGQGLEWMGGINPNSGATKNV  
QKFQGRVTMTADTSIRTAYMELSRLTSDDTAVYYCARGEGDTGSYLGGYWGLGTLVTVSSGGG  
GSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGRAPLLVIYGKNI  
RPSGIPDRFSGSSSGNSASLTITGAQAEDEADYYCNSRDRSGNYLFGVGTKVTVLG

SEQ ID NO 8:

MAQVQLVQSGAEVKKPGESLEISCKGSGYSFANNWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDVRY  
RSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHRVAYSGYDAFDIWGQGTMTVTVSSGG  
GGSGGGGSGGGGSSVLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYPSWYQQKPGQAPVLVIYGKN  
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCHSRDRSGNQVLFGGGTKVTVLG

SEQ ID NO 9:

MAQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGEGGVWGQGTITVTVSSGGGGSGGG  
GSGGGGSDIVMTQSPSTLSAS

En algunas formas de realización, esta invención provee fragmentos de anticuerpo capaces de ligarse a los dominios extracelulares 1-3 de la N-cadherina o al dominio extracelular 4 de la N-cadherina, en donde el fragmento es un cFv. En algunas formas de realización, esta invención provee fragmentos de anticuerpo capaces de ligarse a los dominios extracelulares 1-3 de la N-cadherina o al dominio extracelular 4 de la N-

cadherina, en donde el fragmento es un diacuerpo. Para generar diacuerpos se reemplazó el linker SGGGSGGGSGGGGS con SGGGGS

#### **Métodos de administración y formulación**

[0112] Los anticuerpos anti-N-cadherina o los inmunoconjugados 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.

[0113] Las composiciones para administración comprenderán habitualmente un agente descrito en la presente (por ejemplo, inhibidores de la N-cadherina, anticuerpos de N-cadherina e inmunoconjugados, 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.

**[0114]** 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).

**[0115]** 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.

[0116] 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.

[0117] 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 entrampados 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.

[0118] 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.

[0119] En otras formas de realización, los métodos de la invención con otras terapias de cáncer (por ejemplo, prostatectomía 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 prostatectomía 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

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.

[0121] 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.

[0122] 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.

[0123] 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, sucrosa, 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, sucrosa, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tales como gelatina y glicerina o suspensiones de sucrosa y acacia, y similares que contienen, además del ingrediente activo, vehículos conocidos de la persona con pericia en la especialidad.

[0124] 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.

[0125] 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 parafina.

[0126] 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, topical, 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.

[0127] 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.

[0128] 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.

**[0129]** 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.

**[0130]** 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 .

**[0131]** 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).

#### **EJEMPLOS**

[0132] Se presentan los siguientes ejemplos a título de ilustración, que no tienen por objeto delimitar la invención reivindicada.

**Ejemplo 1: aislación y caracterización de ScFVs humanos específicos con respecto a la N-cadherina humana**

#### **MATERIALES y MÉTODOS**

**Expresión de proteína recombinante N-cadherina y cepas de células.**

[0133] Se generaron dos proteínas recombinantes N-cadherina independientes (Z Wainberg); los dominios extracelulares de N-cadherina uno a tres (ECD1-3) y el cuarto dominio de N-cadherina (ECD4). Se clonó la secuencia cADN utilizando RT-

PCR a partir de una preparación de mRNA. Se clonaron los ácidos nucleicos 160 a 497 para ECD1-3 y los ácidos nucleicos 489 a 603 en el sistema bacterial de expresión en marco con un rótulo 6 histidina en un vector en marco con un rótulo GST. Se indujo la expresión dentro de horas después de la inducción; se aisló la fracción periplásmica y se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía Ni-NTA. Se analizó la proteína en SDS-PAGE para determinar su tamaño y pureza. Se generaron células transfectadas con N-cadherina. Se clonó el cADN de N-cadherina completa en el vector y se transfectó en LNCap por infección. Se utilizaron dos células PC3 y dos cepas de células de próstata DU145 para caracterizar los fragmentos de anticuerpo anti-N-cadherina aislados.

#### **Paneo de biblioteca de fagos**

[0134] Planificamos una biblioteca de fagos inmune que despliega un Fv humano de cadena única (scFv), que contiene  $8.2 \times 10^8$  miembros generados en JD Marks laboratory tal como se describió previamente (Sheets M.D. PNAS 1998). Los fagos se seleccionaron por afinidad para proteínas recombinantes de N-cadherina. ECD1-3 y ECD4 se absorbieron por separado en dos inmuntubos (Nunc). Los inmuntubos se lavaron luego con PBS, se bloquearon con 4% de leche en PBS a temperatura ambiente durante 2 horas, luego se lavaron 3 veces con PBS. Se mezclaron

alícuotas de 1 ml de la biblioteca de scFv visualizada por fagos ( $8 \cdot 10^{11}$  pfu) con 1 ml de 8% de MPBS y se añadieron a los inmunotubos recubiertos con antígeno. Los inmunotubos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunotubos se lavaron luego una vez con 0,05% de Tween 20 en PBS y tres veces con PBS. Los fagos se eluyeron con 1 ml de 100 mM de trietilamina durante 5 minutos y se neutralizaron con 0,5 ml de 1 M de Tris-Hcl pH 7,4. La mitad del fago eluido para cada corrida se congeló mientras que la otra mitad se usó para infectar las células TGI. La amplificación y purificación de fagos se llevaron a cabo tal como se describió con anterioridad (Sheets M.D. PNAS 1998). La selección incluía otras 3 vueltas de paneo similares a la primera vuelta. Se usaron 2 ml de 40  $\mu$ l/ml para recubrir los inmunotubos para las vueltas 1 y 2, mientras que se usaron 20  $\mu$ l/ml para recubrir inmunotubos para las vueltas 3 y 4. La cantidad de lavados se incrementó progresivamente en las vueltas 2, 3 y 4. Los anticuerpos de fagos policlonales de las vueltas 1, 2, 3 y 95 clones objeto de la cuarta vuelta de paneo se evaluaron por medio de ELISA tal como se describió previamente (referencia Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3):581-97.).

#### **Análisis ELISA de clones individuales**

[0135] La unión de 95 clones del fago individual a su blanco se determinó por ELISA (Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97) (Poul M, et al. JMB Volume 301, Issue 5, Páginas 1149-1161). El blanco usado para la selección se empleó para recubrir una placa de ELISA de 96 pocillos. Se determinó el número de scFv por identificación de huella genética de los genes scFv con la enzima de restricción BstNI y se confirmó por la secuenciación del ADN.

#### **Reformateado de scFvs en diacuerpos**

[0136] Se cortaron insertos de ScFv del pHEN1 usando enzimas de restricción NcoI y NotI y se clonaron en el vector pSyn usando los mismos sitios enzimáticos de restricción. Para reformatear scFv en diacuerpo el ligador de 15 a 5 a.a mediante el empalme con PCR de extensión superpuesta (SOE-PCR) (Yazaki PJ, et al. PEDS 2004 May;17(5):481-9). Los productos de SOE-PCR se clonaron en el vector TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron para verificar que no se generaron mutaciones a partir de la PCR. Los constructos del diacuerpo se clonaron finalmente en el vector pSyn1 usando los sitios de restricción de NcoI y NotI.

#### **Expresión y purificación de scFv y diacuerpos**

[0137] Los scFvs y diacuerpos clonados en pSyn1 se transfectaron en las bacterias TG1 para la expresión de proteínas. Las bacterias se cultivaron a una densidad de D.O<sub>600nm</sub> 0,5 antes de inducir la expresión con 1 mM de IPTG. Después de cuatro horas de la inducción, las bacterias se centrifugaron y se preparó la fracción periplásmica. Las proteínas de marca HIS se purificaron en una columna Ni-NTA. La proteína eluida se dializó contra PBS, se concentró y filtró.

#### **Caracterización bioquímica**

[0138] Las proteínas purificadas se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se determinó el tamaño estructural nativo por columnas de exclusión por tamaño (Superdex 75) (Pharmacia).

#### **Citometría de flujo**

[0139] La citometría de flujo se realizó para evaluar la unión de los clones de anticuerpo del fago y diacuerpos a la N-cadherina celular. Para la tinción del anticuerpo del fago se usó sobrenadante concentrado 20 veces. Los clones individual se cultivaron en 20 ml de 2TY a una densidad de D.O<sub>600nm</sub> 0,5 cuando el fago se rescató con los fagos auxiliares. Después de un cultivo de toda la noche, el los fagos monoclonales se

recolectaron del sobrenadante por precipitación con PEG/NaCl y se resuspendieron en 1 ml de PBS/1% de BSA. Para la tinción de citometría de flujo,  $5 \times 10^5$  células se incubaron durante una hora en hielo con 100  $\mu$ l de clon de anticuerpo del fago concentrado en 20x PEG. Las células se lavaron en buffer de flujo (PBS 1%FBS, 1 mM de EDTA, 0,02% de azida sódica) y los clones del anticuerpo del fago se detectaron con anticuerpo anti-M13 monoclonal (Amersham Biosciences). Las células se lavaron y tiñeron con anticuerpo anti-ratón conjugado R-PE. Para la tinción del diacuerpo,  $5 \times 10^5$  células se incubaron durante una hora en hielo con el diacuerpo a una concentración de 2  $\mu$ g/ml en buffer de flujo. Las células se lavaron y el diacuerpo se detectó con 1/100 de anticuerpo anti-c-Myc-biotina en buffer de flujo. Las células se lavaron finalmente y tiñeron con 1/40 estreptavidina-R-PE (SIGMA) en buffer de flujo.

### **Estudios in vivo**

**[0140]** La proteína D4Db se marcó con  $^{124}\text{I}$  y se inyectó en la vena de cola de ratones SCID que portan tumores LAPC9 Aiy ratones desnudos que portan tumores PC3. La visualización de imágenes MicroPET se realizó 4 y 20 horas pos-inyección. Se realizó la biodistribución 20 horas pos- inyección.

**Inmunopurificación**

[0141] Las mismas bibliotecas de fagos no inmune que exhiben anticuerpos Fv de cadena simple humanos (scFv), que contienen  $8,2 \times 10^8$  miembros se inmunopurificaron de modo independiente contra proteína recombinante ECD1-3-6His o ECD4-6HIS. Los resultados de la inmunopurificación que incluyen, entrada, salida, recuperación y enriquecimiento se presentan en la Tabla 1. La inmunopurificación contra un ECD1-3 produjo el enriquecimiento temprano a partir de la ronda 2, mientras que el enriquecimiento solo fue superior a uno en la última ronda de inmunopurificación para el ECD4. Estos resultados son compatibles con el ELISA policlonal ELISA ya que una señal apareció en la segunda ronda de inmunopurificación con ECD1-3 mientras que solo la muestra de la tercera ronda de inmunopurificación con ECD4 mostró una señal.

[0142] Como se muestra en la FIG. 1, los anticuerpos del fago policlonal de las rondas de inmunopurificación 1, 2 y 3 se analizaron por ELISA. Los blancos usados para las rondas de inmunopurificación se usaron para recubrir la placa de ELISA. La unión del anticuerpo del fago se detectó con anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP.

**Tabla 1**

## a) ECD1-3

|         | Proteína<br>inmovili-<br>zada | Entrada<br>(pfu)  | Salida<br>(pfu) | Recupera-<br>ción   | Enriquec-<br>imiento |
|---------|-------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| Ronda 1 | 40 $\mu$ l/ml                 | $8 \cdot 10^{11}$ | $2 \cdot 10^6$  | $2,5 \cdot 10^{-6}$ |                      |
| Ronda 2 | 40 $\mu$ l/ml                 | $5 \cdot 10^{10}$ | $2 \cdot 10^5$  | $4 \cdot 10^{-6}$   | 1,6                  |
| Ronda 3 | 20 $\mu$ l/ml                 | $5 \cdot 10^{11}$ | $4 \cdot 10^6$  | $10^{-5}$           | 2,5                  |
| Ronda 4 | 20 $\mu$ l/ml                 | $2 \cdot 10^{11}$ | $5 \cdot 10^8$  | $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 250                  |

## b) ECD4

|         | Proteína<br>inmovili-<br>zada | Entrada<br>(pfu)    | Salida<br>(pfu) | Recupera-<br>ción    | Enriquec-<br>imiento |
|---------|-------------------------------|---------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| Ronda 1 | 40 $\mu$ l/ml                 | $8 \cdot 10^{11}$   | $2 \cdot 10^7$  | $1,25 \cdot 10^{-5}$ |                      |
| Ronda 2 | 40 $\mu$ l/ml                 | $5 \cdot 10^{10}$   | $10^5$          | $2 \cdot 10^{-6}$    | 0,2                  |
| Ronda 3 | 20 $\mu$ l/ml                 | $5 \cdot 10^{11}$   | $5 \cdot 10^4$  | $10^{-7}$            | 0,05                 |
| Ronda 4 | 20 $\mu$ l/ml                 | $3,5 \cdot 10^{11}$ | $5 \cdot 10^5$  | $1,4 \cdot 10^{-6}$  | 1,4                  |

**Detección**

[0143] Se aislaron 95 de la quinta ronda de selección para ECD1-3 y ECD4 y se analizaron por ELISA. Los 95 clones aislados

de la cuarto ronda de selección para ECD1-3-6HIS se analizaron contra ECD1-3-6HIS y ECD1-3-GST. 93 de los 95 clones fueron positivos cuando se ensayaron con ECD1-3 6HIS. Veintidós de los clones positivos para ECD1-3 6HIS también fueron positivos para ECD1-3-GST. Los veintidós clones positivos para ECD1-3 6HIS y ECD1-3-GST se identificaron por huella genética para aislar clones únicos. 7 clones tenían solo una copia A7, C7, C12, D10, E4, E10 y G2. B12 tenía otra copia. D4 tenía 3 copias diferentes y A8 tenía otras 8 copias. El inserto A8 NcoI-NotI fue más corto que los otros clones cuando se analizó en el gel de agarosa. Los 95 clones aislados de la cuarta ronda de selección para ECD4-6HIS se analizaron contra ECD4-6HIS y ECD1-3 6HIS. Los 95 clones analizados fueron positivos cuando se analizaron en ECD4-6HIS y negativos cuando se analizaron en ECD1-3 6HIS. Nosotros seleccionamos 8 de los clones positivos que dieron la señal más fuerte en el ELISA y se los identificó por huella genética. Estos 8 clones tenían la misma huella genética. Uno de estos clones, A1 se llamó A14

**[0144]** En síntesis, nosotros seleccionamos 10 clones del fago individual que unen proteína recombinante ECD1-3 de N-cadherina (A7, A8, B12, C7, C12, D4, D10, E4, E10, G2) y un clon del fago que une proteína recombinante ECD14 de N-cadherina (A14)

### Unión de clones del fago a la N-cadherina de la superficie celular

[0145] Los once clones del fago individuales seleccionados por ELISA se ensayaron para determinar la unión celular de las células positivas a N-cadherina (células transfectadas con N-cadherina PC3 y LNCaP) por citometría de flujo. Los clones también se analizaron para determinar reactividad cruzada en las células negativas para N-cadherina (DU-145 y LNCap). En estos experimentos, se generó un segundo lote de anticuerpos del fago y se analizaron nuevamente por ELISA. Ambos resultados de ELISA para los clones seleccionados se presentan en la Tabla 2. Todos los clones del fago excepto uno tiñen con D4 las células positivas para N-cadherina pero no las células negativas para N-cadherina. La intensidad de fluorescencia media para cada clon se presenta en la Tabla 2. Nosotros seleccionamos A14 como el único anti-ECD4 y C7 y E4 ya que estos clones del anticuerpo del fago muestran la tinción celular más fuerte al ser reformateados en el diacuerpo. Se generó el diacuerpo; se usaron A14Db, C7Db y E4 Db para teñir las células positivas y negativas para N-cadherina. A14Db y E4Db mostraron una tinción débil comparable mientras que C7 Db mostró tinción más fuerte de las células positivas para N-cadherina cuando se analizaron por citometría de flujo (datos

nos mostrados). Sin embargo C7Db también muestra tinción de una célula negativa para N-cadherina.

[0146] la proteína de scFv de estos clones se han secuenciado.

Las secuencias se listan a continuación:

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| A14ScFv             | SEQ ID NO: 1 |
| A7 ScFv incompleto  | SEQ ID NO: 2 |
| A8 ScFv truncado    | SEQ ID NO: 3 |
| B12 ScFv incompleto | SEQ ID NO: 4 |
| C7 ScFc             | SEQ ID NO: 5 |
| C12 ScFv incompleto | SEQ ID NO: 6 |
| D4 ScFv             | SEQ ID NO: 7 |
| E4 ScFv             | SEQ ID NO: 8 |
| E10 ScFv incompleto | SEQ ID NO: 9 |

Tabla 2

| Clon             | Proteína de fusión | Número de copias | 1° ELISA (O.D) | 2do ELISA (O.D) | Citometría de flujo (MFI) |
|------------------|--------------------|------------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| A14(AI)          | HIS<br>Domain 4    | 1                | 0.32           | ?               | 57                        |
| A7               | GST<br>HIS         | 1                | 0.1<br>0.26    | 0<br>0.38       | 48                        |
| A8<br>(truncado) | GST<br>HIS         | 9                | 0.17<br>0.25   | 0.05<br>0.11    | 30                        |
| B12              | GST<br>HIS         | 2                | 0.2<br>0.18    | 0.26<br>0.4     | 91                        |
| C7               | GST<br>HIS         | 1                | 0.1<br>0.23    | 0.19<br>0.35    | 110                       |
| C12              | GST<br>HIS         | 1                | 0.34<br>0.2    | 0.16<br>0.31    | 38                        |
| D4               | GST<br>HIS         | 4                | 0.31<br>0.38   | 0.15<br>0.24    | 0                         |
| D10              | GST<br>HIS         | 1                | 0.22<br>0.24   | 0.13<br>0.28    | 25                        |
| E4               | GST<br>HIS         | 1                | 0.17<br>0.35   | 0.21<br>0.39    | 216                       |
| E10              | GST<br>HIS         | 1                | 0.13<br>0.21   | 0.14<br>0.35    | 12                        |
| G2               | GST<br>HIS         | 1                | 0.09<br>0.26   | 0.06<br>0.14    | 36                        |

Tabla 3

|       | Tumor | Sangre | Hígado | Bazo | Riñón | Pulmón |
|-------|-------|--------|--------|------|-------|--------|
| LAPC9 | 0,6   | 0,9    | 0,3    | 0,2  | 0,6   | 0,3    |
| AI    |       |        |        |      |       |        |
| PC3   | 0,3   | 0,6    | 0,3    | 0,1  | 0,6   | 0,3    |

Los datos de biodistribución se obtuvieron a 22h pos- inyección de los tumores o ratones.

Tumor/sangre =0,7 (LAPC9) y 0,5 (PC3)

### Selección del mejor ligador

[0147] En un esfuerzo adicional para seleccionar el mejor de los 10 ligadores ECD1-3, se generaron estos clones del fago, se redujeron en las células LNCaP y se inmunopurificaron dos veces contra las células LNCaP transfectadas con N-cadherina. Los clones se secuenciaron. Si bien, la tinción de las células LNCaP transfectadas con N-cadherina con los clones del fago D4 fue negativa, el clon D4 fue prevalente con X copias.

[0148] Se generó el diacuerpo D4 (D4Db) y se comparó con E4Db por la tinción con PC3 y DU145 (Figura 2). E4Db y D4Db tiñeron PC3 y fueron negativos para DU145. La tinción de D4Db de PC3 fue más fuerte que E4Db (FIG. 4).

[0149] Como se muestra en la FIG. 2, las células positivas para N-cadherina (PC3) se incubaron con diacuerpos, se tiñeron y analizaron por citometría de flujo. Solo anticuerpos secundarios: anti-C-Myc-FITC (relleno en gris), A14 Db (línea discontinua), E4 Db (línea fina) C7 Db (línea gruesa).

[0150] Como se muestra en la FIG. 3, las células negativas para N-cadherina (DU 145) y células positivas para N-cadherina (PC3) se incubaron con C7 Db, se tiñeron y analizaron por citometría de flujo. Solo anticuerpos secundarios: anti-C-Myc-FITC (relleno en gris), C7 Db (línea entera).

[0151] Como se muestra en la FIG. 4, las células negativas para N-cadherina (DU 145) y las células positivas para N-cadherina (PC3) se incubaron con diacuerpos, se tiñeron y analizaron por citometría de flujo. Solo anticuerpos secundarios: anti-C-Myc-biotina en esptreptavidina R-PE (relleno en gris), E4 Db (línea discontinua), D4 Db (línea entera).

[0152] La FIG. 5 muestra la localización del tumor de D4 Db marcado con  $^{124}\text{I}$  en tumores LAPC9 AI. Se registraron las secciones coronales 4 horas después de la inyección.

[0153] 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.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el fragmento es un diacuerpo.

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

(a) obtener una muestra de tejido de prueba tomada de un individuo con riesgo de tener 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 prueba por comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; diagnosticando aquí dicho cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa con niveles normales o bajos, o está expresada por un subconjunto de células, o está sobreexpresada; y

(c) administrar una cantidad efectiva de anticuerpo de N-cadherina o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 al individuo en riesgo de tener cáncer que expresa una proteína N-cadherina.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha muestra de tejido es tejido de próstata o vejiga.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un scFv.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un diacuerpo.

18. Un método de diagnóstico de un paciente con cáncer, que comprende las etapas de:

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

(b) determinar la presencia o ausencia o cantidad de la proteína N-cadherina en la muestra de tejido de prueba por comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer poniendo en contacto una muestra con una cantidad efectiva de un anticuerpo de N-cadherina o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4; diagnosticando aquí dicho cáncer que expresa una proteína N-cadherina, en donde la proteína N-cadherina se expresa con

niveles normales o bajos, o está expresada por un subconjunto de células, o está sobreexpresada.

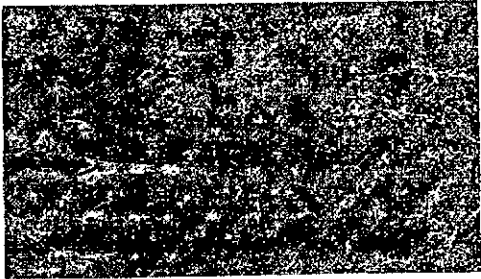
19. Un método de identificación de células madre de cáncer, que comprende las etapas de:

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

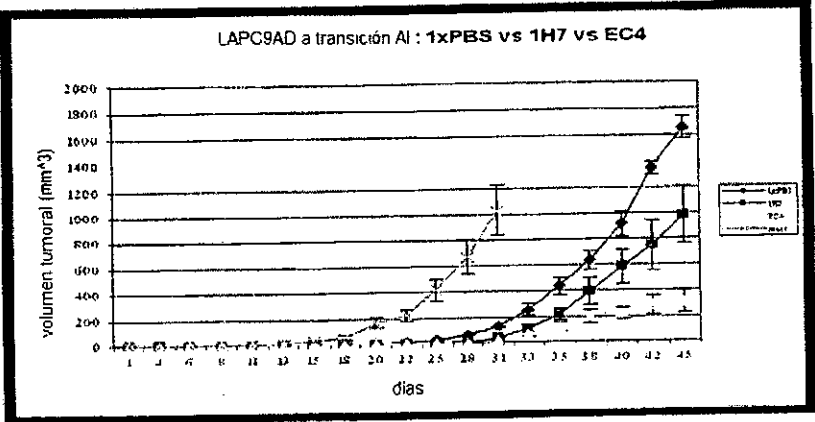
(b) determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra de tejido de prueba por comparación con una muestra de tejido de control tomada de un individuo del que se sabe que es negativo al cáncer; en donde la proteína N-cadherina se expresa con niveles normales o bajos, o se expresa mediante un subconjunto de las células vástago y no está sobreexpresada, usando los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 4.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha muestra de tejido es tejido de próstata o vejiga.

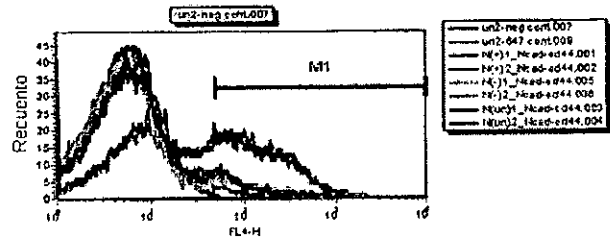
a.



b.



Resultados de FACs en tumores clasificados de N-cad procesados

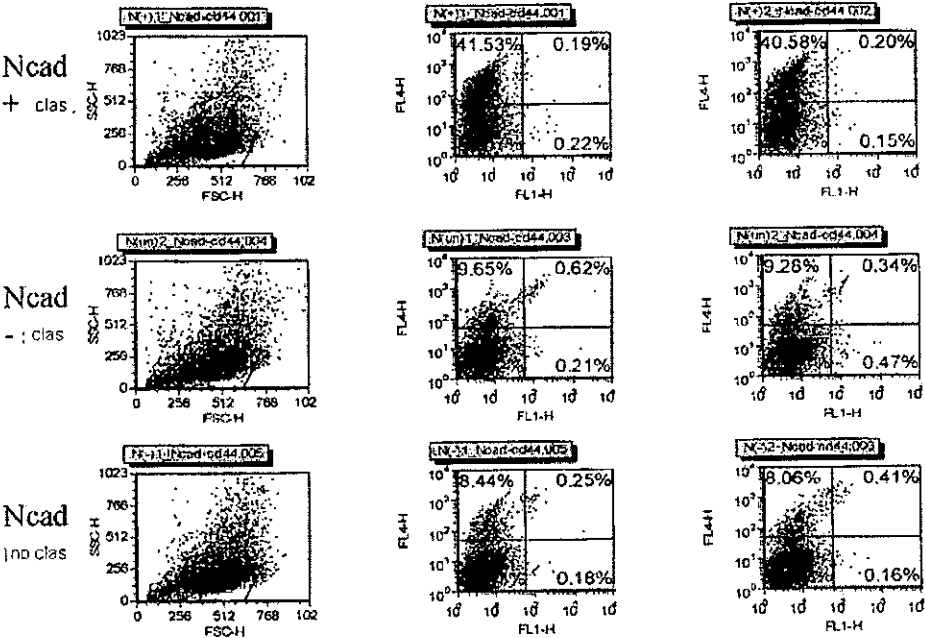


| FCS Filename          | Parameter | Marker | % of Gated Cells |
|-----------------------|-----------|--------|------------------|
| un2-neg cont.007      | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| un2-neg cont.007      | FL4-H     | I      | 0.19             |
| un2-047 cont.008      | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| un2-047 cont.008      | FL4-H     | I      | 3.32             |
| N(+)_1_Ncad-cd44.001  | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(+)_1_Ncad-cd44.001  | FL4-H     | I      | 41.72            |
| N(+)_2_Ncad-cd44.002  | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(+)_2_Ncad-cd44.002  | FL4-H     | I      | 40.78            |
| N(-)_1_Ncad-cd44.006  | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(-)_1_Ncad-cd44.006  | FL4-H     | I      | 8.7              |
| N(-)_2_Ncad-cd44.008  | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(-)_2_Ncad-cd44.008  | FL4-H     | I      | 8.48             |
| N(un)_1_Ncad-cd44.003 | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(un)_1_Ncad-cd44.003 | FL4-H     | I      | 10.27            |
| N(un)_2_Ncad-cd44.004 | FL4-H     | Ning.  | 100.0            |
| N(un)_2_Ncad-cd44.004 | FL4-H     | I      | 8.87             |

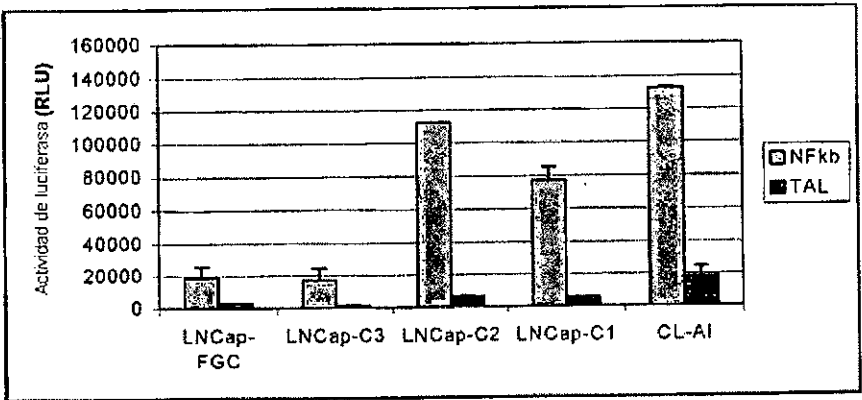
← Ncad(+) clas      % prom      41.25%

← Ncad(-) clas      8.58%

← Ncad no clas      9.95%



La N-cadherina activa NF-KB



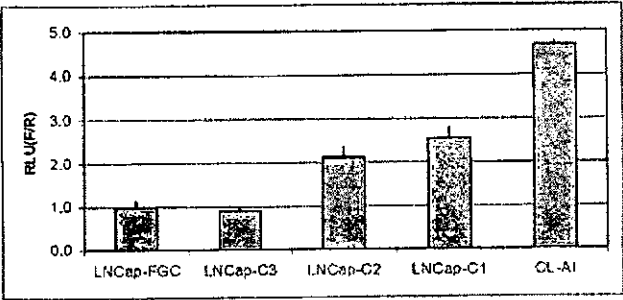
Suero normal

Ensayo del reportero NF kappa B: TAL en control negativo

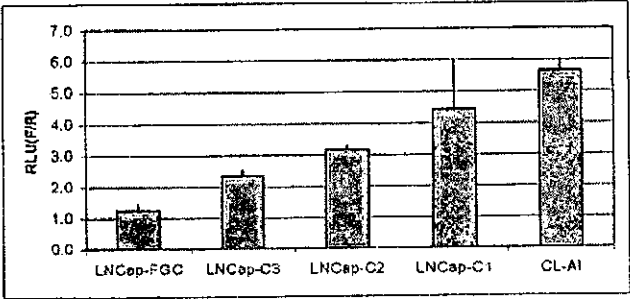
7/16

La N-cadherina activa NF-KB

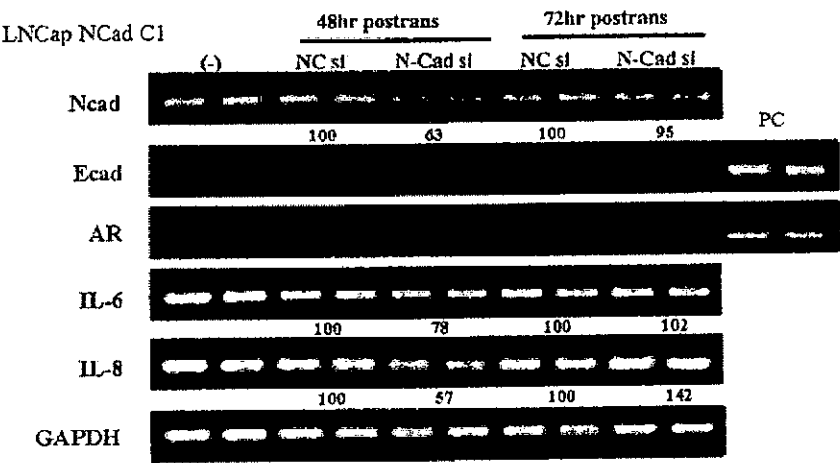
Suero normal



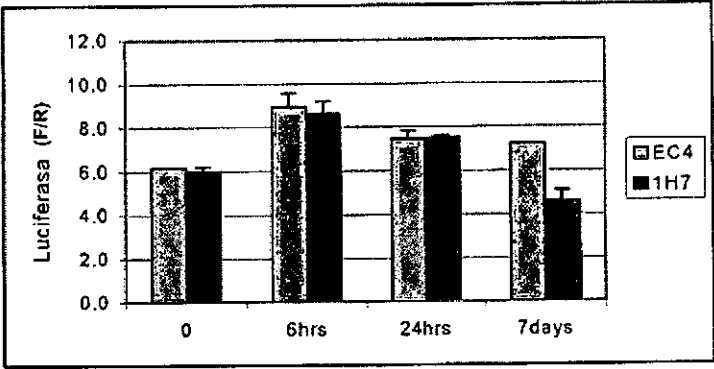
suero DCC  
andr geno agotado



El knockdown de N-cadherina conduce a la regulación hacia abajo de IL-6 e IL-8

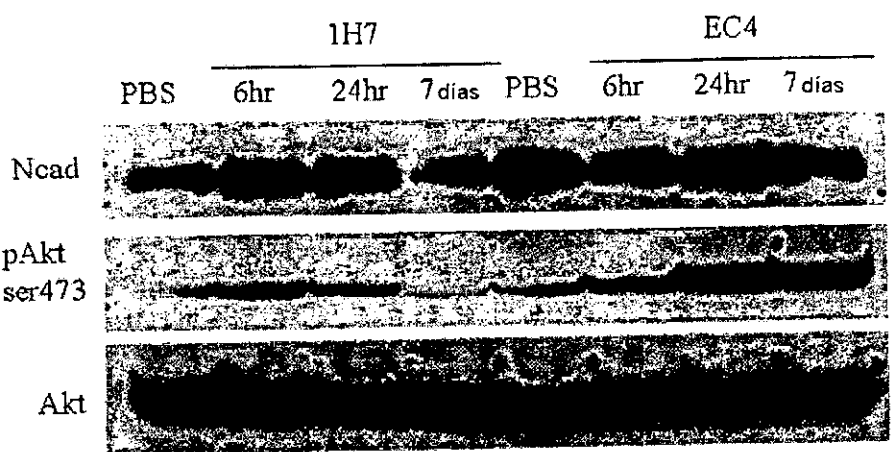


Actividad de NFkB después del tratamiento de anticuerpos de N-cadherina



Actividad de NFkB después de 7 días de tratamiento de 1H7, reducida ligeramente. Esto concuerda con western blot donde la expresión de pAkt y Ncad era reducida.

Los anticuerpos específicos de N-cadherina se activan, luego se desregula hacia abajo la activación de Akt



ASP

199

PCT/US2009/063881

## 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

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) 22 JULY 2010 (22.07.2010)

Applicant's or agent's file reference

2307K-1934-1

02307K-193410PC

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2009/063881 ✓

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):

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 PCT Applicant's Guide, International Phase, paragraphs 9.004 - 9.011.

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 any 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

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. Following the expiration of 30 months from the priority date, these comments will also be made available to the public.

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 before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

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.

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.

For details about the applicable time limits, Office by Office, see [www.wipo.int/pct/en/texts/time\\_limits.html](http://www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html) and 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

Authorized officer

COMMISSIONER

Telephone No. 82-42-481-8754



Form PCT/ISA/220 (Draft for Consultation, July 2010)

Article 19.3 File IDS  
NEW 8-318-2210

\* 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 : **A496PRX4**

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](mailto: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:<br>PARENT ANNETTE S.<br>TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW<br>LLP TWO EMBARCADERO CENTER,<br>EIGHTH FLOOR SAN FRANCISCO CA<br>94111-3834 ESTADOS UNIDOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p style="text-align: center;">PCT</p> <p style="text-align: center;"><b>NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL<br/>INFORME DE BÚSQUEDA<br/>INTERNACIONAL Y DE LA OPINIÓN<br/>ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE<br/>BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA<br/>DECLARACIÓN<br/>(Norma 44.1 del PCT)</b></p> <p>Fecha de remisión (día/mes/año)<br/>         22 de julio de 2010 (22-07-<br/>         2010)</p> |
| Referencia de archivo del<br><br>Solicitante o Agente<br><br>2307K1934-1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <p><b>PARA OTROS TRAMITES</b></p> <p>Véanse los párrafo 1 y 4 a<br/>         continuación</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Solicitud de Patente<br><br>Internacional N°<br><br>PCT/US2009/063881                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>Fecha de presentación<br/>         internacional (día/mes/año):<br/><br/>         10 de noviembre de 2009 (10-<br/>         11-2009)</p>                                                                                                                                                                                                                                         |
| Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y<br>otros                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Por la presente se notifica al solicitante que el<br/>         informe de búsqueda internacional y la opinión escrita de la<br/>         Autoridad de Búsqueda Internacional se han establecido y se<br/>         transmiten con la presente:</p> <p style="padding-left: 40px;">Presentación de modificaciones y testimonio conforme a la<br/>         Cláusula 19.</p> <p style="padding-left: 40px;">El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar<br/>         las reivindicaciones de la solicitud de patente</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

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 | N° Telefónico: 82-42-481-8754 |
| N° de Fax 82-42-472-7140                                                                   |                               |

\*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): A496PRX4

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](mailto:ipkc@ipkcenter.com)

Número telefónico: +1 703 388 1066

Fax: +1 703 388 1084

ASP

PCT/US2009/063881

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

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

Date of mailing  
(day/month/year) 22 JULY 2010 (22.07.2010)

Applicant's or agent's file reference  
2307K-1934-1 **02367K-19341OPC**  
FOR FURTHER ACTION  
See paragraph 2 below

International application No. **PCT/US2009/063881** ✓  
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  
**C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, C12N 15/13(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. **10-22-10**  
For further options, see Form PCT/ISA/220. **9-10-10** ✓

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.  
**Response to Written Opinion**  
**10-22-10**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                       |                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <br>Name and mailing address of the ISA/KR<br>Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 139<br>Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302<br>-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. 82-42-472-7140 | Date of completion of this opinion<br>20 JULY 2010 (20.07.2010)                       | Authorized officer<br>KIM, JI YUN<br>Telephone No. 82-42-481-8288 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                   |

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
**PCT/US2009/063881**

Box No. 1 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/US2009/063881**

**Box No. IV Lack of unity of invention**

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
  - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
  - ☐ not paid additional fees

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

The separate inventions found by the Search Authority are as follows:

Invention 1: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 4 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. (claims 1-3; claims 7-27 partially)

Inventions 2: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 1-3 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. (4-27 partially)

Inventions 3-9: as in invention 2, but relating to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9. (4-27 partially)

The common technical feature among Inventions 1-9 is "a monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain of N-cadherin". However, such antibodies are already disclosed in D1(KIM et al.). Thus, the common technical feature is not considered to contribute over the prior art as a whole, and the present application does not meet the requirements of unity of invention (Rule 13.1 PCT).

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application :

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

**PCT/US2009/063881**

**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 | 1-27 | YES |
|                               | Claims | NONE | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | NONE | YES |
|                               | Claims | 1-27 | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-27 | YES |
|                               | Claims | NONE | NO  |

**2. Citations and explanations :**

**1. Remarks of the Industrial Applicability**

For the assessment of the present claims 7-27 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT. The patentability can also be dependent on the formulation of the claims.

The search has been carried out based on the alleged effects of the composition.

**2. The following documents are referred to in this written opinion:**

D1: KIM, J.-B. et al. 'N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility.'  
Journal of Cell Biology. Vol. 151(6), pp. 1193-1205 (11 December 2000)

D2: HARRISON, O. J. et al. 'The mechanism of cell adhesion by classical adherins: the role of domain 1.'  
Journal of Cell Science. Vol. 118(Pt.4), pp. 711-721 (25 January 2005)

D3: TRAN, N. L. et al. 'N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines.'  
American Journal of Pathology. Vol. 155(3), pp. 787-798 (September 1999)

D4: US 6682901 B2

**3. Novelty and Inventive Step [PCT Article 33(2) and 33(3)]**

3.1 None of the prior art discloses a monoclonal antibody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,2,3,4,5,6,7,8, or 9. Thus, novelty for claims 1-27 is acknowledged.

3.2 as to claims 1-3

The document D1 is considered to be the closest prior art for claims 1-3. D1 discloses a monoclonal antibody that binds to extracellular domain (ECD) 4 of N-cadherin.

Claims 1-3 differ from D1 in that they related to human and fragmented anti-ECD antibody. However, methods for making of, as well as the advantages of human and/or fragmented antibodies were known in the art. The description of the application does not provide experimental data supporting that the antibody has an unexpected or advantageous effect.

Therefore, the subject-matter of claims 1-3 is not inventive.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2009/063881

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.  
Continuation of:

Box No. V.

3.3 as to claims 4-6

The document D2 is considered to be the closest prior art for claims 4-6. D2 discloses a monoclonal antibody that binds to extracellular domain (ECD) 1 of N-cadherin, which is considered to bind to ECD 1-3.

Claims 4-6 differ from D2 in that they related to human and fragmented anti-ECD antibody. However, methods for making of, as well as the advantages of human and/or fragmented antibodies were known in the art. The description of the application does not provide experimental data supporting that the antibody has an unexpected or advantageous effect.

Therefore, the subject-matter of claims 4-6 is not inventive.

3.4. as to claims 7-27

Claims 7-17 are directed to a method of treating a cancer patient by administering N-cadherin antibody of claim 1 or claim 4; claim 18 is directed to a method of diagnosing a cancer patient; and claims 19-27 are directed to a method of identifying cancer stem cells.

D3 discloses that N-cadherin is expressed in prostate cancer cell line and the expression of N-cadherin is associated with the loss of the epithelial phenotype in invasive prostate adenocarcinoma cell lines.

D4 discloses methods for diagnosing cancer as well as leukemia using antibodies to N-cadherin.

The subject-matter of claims 7-27 is not inventive since the antibody of claim 1 or claim 4 is not inventive in the light of D1 or D2, and it is considered to be obvious for a skilled person in the art to contemplate a method of treating or diagnosing cancer or cancer stem cells using anti-N-cadherin antibodies in the light of D3 and D4.

4. Industrial Applicability [PCT Article 33(4)]

The subject-matter of claims 1-27 is considered to be industrially applicable.

## TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la

AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

|                                                                                                                                                                  |                                                                                                                             |                                                                                                   |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Para:<br><br>PARENT ANNETTE S.<br>TOWNSEND AND TOWNSEND AND<br>CREW LLP TWO EMBARCADERO<br>CENTER, EIGHTH FLOOR SAN<br>FRANCISCO CA 94111-3834<br>Estados Unidos |                                                                                                                             | PCT<br>OPINIÓN ESCRITA DE LA<br>AUTORIDAD DE BÚSQUEDA<br>INTERNACIONAL<br>(Norma 43bis.1 del PCT) |  |
|                                                                                                                                                                  |                                                                                                                             | Fecha de remisión (día/mes/año)<br><br>22 de julio de 2010 (22-07-<br>2010)                       |  |
| Referencia de archivo del<br><br>Solicitante o Agente<br><br>2307K-1934-1                                                                                        |                                                                                                                             | PARA OTROS TRAMITES<br><br>ver párrafo 2 más abajo                                                |  |
| Solicitud<br><br>Internacional No.<br><br>PCT/US2009/063881                                                                                                      | Fecha de<br><br>Presentación<br><br>internacional<br><br>(día, mes, año)<br><br>10 de noviembre de<br><br>2009 (10-11-2009) | Fecha de prioridad<br><br>(día/mes/año)<br><br>10 de noviembre de<br><br>2008 (10-11-2008)        |  |
| Clasificación Internacional de Patente (IPC) o tanto<br>clasificación nacional como IPC<br><br>C07K 16/18(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i  |                                                                                                                             |                                                                                                   |  |
| Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y<br><br>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<br>correspondencia de la<br>ISA/KR<br>Oficina de la Propiedad<br>Intelectual de Corea<br>Complejo Gubernamental-<br>Daejeon, 139 Seonsa-ro,<br>Seo-gu, Daejeon 302-701,<br>República de Corea<br>N° de Fax 82-42-472-7140 | Fecha de<br>finalización<br>de esta<br>opinión<br>20 de julio de<br>2010 (20-07-<br>2010) | Funcionario<br>autorizado<br>MUN, Tae Jin<br>N° Telefónico: 82-<br>42-481-8288 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|

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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| OPINIÓN ESCRITA DE LA<br>AUTORIDAD DE BÚSQUEDA<br>INTERNACIONAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Solicitud de Patente Internacional N°<br>PCT/US2009/063881 |
| <b>Casillero N° I. Fundamento de esta opinión.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                            |
| <p>1. Con respecto al <b>idioma</b>, esta opinión se ha establecido basada en:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> la solicitud de patente internacional en el idioma en que se presentó.</p> <p><input type="checkbox"/> 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)).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la <b>rectificación de un error evidente</b> autorizada o notificada por esta autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43bis.1(a)).</p> <p>3. Con respecto a todas las <b>secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos</b> que se revelan en la solicitud de patente internacional, esta opinión se ha establecido basado en:</p> <p>a. un listado de secuencias presentado o provisto</p> <p><input type="checkbox"/> en papel</p> <p><input type="checkbox"/> una forma electrónica</p> <p>b. fecha de presentación o provisión</p> |                                                            |

☐ 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/US2009/063881  
INTERNACIONAL

---

**Casillero N° IV. Falta de unidad de invención**

---

1. ☐ En respuesta a la invitación (Formulario PCT/IS/206)  
para pagar aranceles adicionales, el solicitante, dentro  
del plazo aplicable, ha:

☐ pagado aranceles adicionales;

☐ pagado aranceles adicionales bajo protesta y, cuando  
corresponde, el arancel de protesta.

☐ pagado aranceles adicionales bajo protesta pero no se  
pagó el arancel de protesta aplicable

☐ no pagó aranceles adicionales

2. ☒ La Autoridad consideró que el requisito de unidad de  
invención no se cumple y no elige invitar al solicitante  
a pagar los aranceles adicionales

3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de  
invención de acuerdo con la Norma 13.1, 13.2 y 13.3

☐ se cumple

☒ no se cumple por los siguientes motivos:

Las invenciones separadas que halló la Autoridad de Búsqueda  
son las siguientes:

Invención 1: Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él

---

---

capaz de unirse al dominio extracelular 4 de N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 1. (reivindicaciones 1-3; reivindicaciones 7-27 parcialmente)

Invención 2: Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él capaz de unirse al dominio extracelular 1-3 de N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 2 (4-27 parcialmente)

Inventiones 3-9: como en la invención 2, pero en relación con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9. (4-27 parcialmente).

La característica técnica común entre las invenciones 1-9 es "un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él capaz de unirse al dominio extracelular de N-cadherina". Sin embargo, dichos anticuerpos también se revelan en D1(KIM et al). Es decir, la característica técnica común no se considera que contribuya por encima del arte previo en su totalidad y la presente solicitud de patente no cumple con los requisitos de unidad de invención (Norma 13.1 del PCT).

4. En consecuencia, este informe se ha establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud de patente

---

---

internacional

☒ todas las partes

☐ las partes relacionadas con las reivindicaciones N°

---

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

OPINIÓN ESCRITA DE LA Solicitud de Patente Internacional N°

AUTORIDAD DE BÚSQUEDA PCT/US2009/063881

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 1-27 SÍ

Reivindicaciones NINGUNA NO

Paso Inventivo (IS) Reivindicaciones: NINGUNA SÍ

Reivindicaciones 1-27 NO

Aplicabilidad industrial (IA) Reivindicaciones 1-27 SÍ

Reivindicaciones: NINGUNA NO

2. Citas y explicaciones:

1. Observaciones de la Aplicabilidad Industrial

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 7-27  
sobre la cuestión de si tienen aplicabilidad industrial, no

existen criterios unificados en el PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones.

La búsqueda se ha realizado basado en los efectos supuestos de la composición.

**2. En esta opinión escrita se citan los siguientes documentos:**

D1: KIM, J.-B. et al. 'Repetición extracelular de N-Cadherina 4 media la transición de epitelial a mesenquimal y la motilidad aumentada'. Diario de Biología Celular. Vol. 151(6), páginas 1193-1

D2: HARRISON, O. J. et al. "El mecanismo de la adhesión a las células por cadherinas clásicas: el papel del dominio 1" Diario de Ciencia Celular. Volumen 118(Pt.4), páginas 711-721 (25 de enero de 2005)

D3: TRAN, N. L. et al. 'Expresión de N-cadherina en líneas de células de carcinoma de próstata humano.' Diario Estadounidense de Patología. Vol. 155(3), páginas 787-798 (Septiembre de 1999)

D4: US 6682901 B2

**2. Novedad y Paso Inventivo [Cláusulas 33(2) y 33(3) del PCT]**

3.1. Ninguno de los documentos del arte previo revela un

---

anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9. Por lo tanto, se reconoce la novedad para las reivindicaciones 1-27.

3.2 en cuanto a las reivindicaciones 1-3

El documento D1 se considera que es el arte previo más cercano para las reivindicaciones 1-3. D1 revela un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio extracelular (ECD) 4 de N-cadherina.

Las reivindicaciones 1-3 difieren de D1 en que se relacionan con el anticuerpo anti-ECD humano y fragmentado. Sin embargo, los métodos para la elaboración así como las ventajas de anticuerpos humanos y/o fragmentados eran conocidos en el arte. La descripción de la solicitud de patente no brinda datos experimentales que respaldan que el anticuerpo tiene un efecto inesperado o ventajoso.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1-3 no es inventivo.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |          |    |                   |               |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|----|-------------------|---------------|----|
| OPINIÓN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ESCRITA | DE       | LA | Solicitud         | Internacional | N° |
| AUTORIDAD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DE      | BÚSQUEDA |    | PCT/US2009/005029 |               |    |
| INTERNACIONAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |          |    |                   |               |    |
| <b>Casillero Complementario</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |          |    |                   |               |    |
| <p>En caso de que el espacio en que cualquiera de los casilleros precedentes sea insuficiente.</p> <p>Continuación de:</p> <p>Casillero N° V.</p> <p>3.3 en cuanto a las reivindicaciones 4-5</p> <p>El documento D2 se considera el arte previo más cercano para las reivindicaciones 4-6. D1 revela un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular (ECD) 1 de N-cadherina, que se considera que se une a ECD 1-3.</p> <p>Las reivindicaciones 4-6 difieren de D2 en que están relacionadas con el anticuerpo anti-ECD humano y fragmentado. Sin embargo, los métodos para la elaboración así como las ventajas de anticuerpos humanos y/o fragmentados eran conocidos en el arte. La descripción de la solicitud de patente no brinda datos experimentales que respaldan que el anticuerpo tiene un efecto inesperado o ventajoso.</p> <p>En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 4-6 no es inventivo.</p> <p>3.4. en cuanto a las reivindicaciones 7-27</p> |         |          |    |                   |               |    |

Las reivindicaciones 7-27 se refieren a un método de tratamiento de un paciente con cáncer mediante la administración de un anticuerpo de N-cadherina de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4; la reivindicación 18 se refiere a un método de diagnóstico de un paciente con cáncer; y las reivindicaciones 19-27 se refieren a un método de identificación de células madre cancerosas.

D3 revela que N-cadherina se expresa en la línea de células del cáncer de próstata y la expresión de N-cadherina está asociada a la pérdida del fenotipo epitelial en las líneas de células de adenocarcinoma de próstata invasivo.

D4 revela métodos para el diagnóstico del cáncer así como la leucemia usando anticuerpos a N-cadherina.

El objeto de las reivindicaciones 7-27 no es inventivo ya que el anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 no es inventivo a la luz de D1 o D2 y se considera que es obvio para un experto en el arte contemplar un método para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer o de células madres cancerosas usando anticuerpos anti-N-cadherina a la luz de D3 y D4.

#### 4. Aplicabilidad Industrial (Cláusula 33(4) del PCT)

El objeto de las reivindicaciones 1-27 se considera aplicable industrialmente.

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                                       |                                                                                                           |                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>2307K-1934-1                 | <b>FOR FURTHER ACTION</b> <small>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.</small> |                                                                                   |
| International application No.<br><b>PCT/US2009/063881</b>             | International filing date (day/month/year)<br><b>10 NOVEMBER 2009 (10.11.2009)</b>                        | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>10 NOVEMBER 2008 (10.11.2008)</b> |
| Applicant<br><b>THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al</b> |                                                                                                           |                                                                                   |

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 7 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. 15  
☒ 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/US2009/063881

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

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

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

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

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

See Extra sheet.

- 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/US2009/063881

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K 16/18; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/567                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                          | Relevant to claim No.                                                                                                                                      |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | KIM, J.-B. et al. 'N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility.' | 1-3                                                                                                                                                        |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Journal of Cell Biology. Vol. 151(6), pp. 1193-1205 (11 December 2000)<br>See p.1201, left column.                          | 7-27                                                                                                                                                       |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | HARRISON, O. J. et al. 'The mechanism of cell adhesion by classical cadherin s: the role of domain 1.'                      | 4-6                                                                                                                                                        |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Journal of Cell Science. Vol. 118(Pt.4), pp. 711-721 (25 January 2005)<br>See p. 715, left column.                          | 7-27                                                                                                                                                       |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | TRAN, N. L. et al. 'N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines.'                                          | 7-27                                                                                                                                                       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | American Journal of Pathology. Vol. 155(3), pp. 787-798 (September 1999)<br>See the abstract.                               |                                                                                                                                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | US 6682901 B2 (BLASCHUK; OREST W. et al.) 27 January 2004<br>See the abstract.                                              | 7-27                                                                                                                                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
| Date of the actual completion of the international search<br>20 JULY 2010 (20.07.2010)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                             | Date of mailing of the international search report<br>22 JULY 2010 (22.07.2010)                                                                            |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br> Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. 82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                             | Authorized officer<br>KIM, JI YUN<br>Telephone No. 82-42-481-8288<br> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2009/063881**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                           |                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
| A                                                     | ALEXANDER, N. R. 'N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1.'<br>Cancer Research. Vol. 66(7), pp. 3365-3369 (1 April 2006)<br>See the abstract. | 1-27                  |
| A                                                     | WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 September 2007<br>See the abstract.                                                                                                             | 1-27                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/063881

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6682901 B2                             | 27.01.2004          | AU 1999-35906 A1           | 23.11.1999          |
|                                           |                     | AU 1999-35906 B2           | 08.08.2002          |
|                                           |                     | AU 1999-35907 A1           | 23.11.1999          |
|                                           |                     | 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 2328112-A1              | 11.11.1999          |
|                                           |                     | CA 2404202-A1              | 04.10.2001          |
|                                           |                     | EP 1075494 A2              | 14.02.2001          |
|                                           |                     | EP 1075662 A2              | 14.02.2001          |
|                                           |                     | EP 1366076 A2              | 03.12.2003          |
|                                           |                     | EP 1970383 A1              | 17.09.2008          |
|                                           |                     | JP 2002-513804 A           | 14.05.2002          |
|                                           |                     | JP 2002-513937 A           | 14.05.2002          |
|                                           |                     | JP 2002-513937 T           | 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 2004-0248219 A1         | 09.12.2004          |
|                                           |                     | US 2004-0248220 A1         | 09.12.2004          |
|                                           |                     | US 2005-0203025 A1         | 15.09.2005          |
|                                           |                     | US 2005-0215482 A1         | 29.09.2005          |
|                                           |                     | US 2005-0222037 A1         | 06.10.2005          |
|                                           |                     | US 2006-0118925 A1         | 08.06.2006          |
|                                           |                     | US 2007-0127211 A1         | 07.06.2007          |
|                                           |                     | US 2008-0137300 A1         | 12.06.2008          |
|                                           |                     | 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 6962969 B2              | 08.11.2005          |
|                                           |                     | US 7481999 B2              | 27.01.2009          |
|                                           |                     | US 7554190 B2              | 30.06.2009          |
|                                           |                     | US 7663227 B2              | 16.02.2010          |
|                                           |                     | US 7755184 B2              | 13.07.2010          |
|                                           |                     | WO 01-72956 A2             | 04.10.2001          |
|                                           |                     | WO 01-72956 A3             | 04.10.2001          |
|                                           |                     | WO 2008-073707 A2          | 19.06.2008          |
|                                           |                     | WO 2008-073707 A3          | 19.06.2008          |
|                                           |                     | WO 2009-100374 A1          | 13.08.2009          |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2009/063881**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2007-109347 A2                         | 27.09.2007          | WO 99-57149 A2             | 11.11.1999          |
|                                           |                     | WO 99-57565 A2             | 11.11.1999          |
|                                           |                     | WO 99-57565 A3             | 11.11.1999          |
|                                           |                     | WO 99-57565A3              | 30.03.2000          |
|                                           |                     | 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 A           | 27.08.2009          |
|                                           |                     | 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          | 27.09.2007          |
|                                           |                     | WO 2007-109347 A3          | 16.10.2008          |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/063881

The separate inventions found by the Search Authority are as follows:

Invention 1: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 4 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. (claims 1-3; claims 7-27 partially)

Inventions 2: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 1-3 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. (4-27 partially)

Inventions 3-9: as in invention 2, but relating to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3,4,5,6,7,8, or 9. (4-27 partially)

The common technical feature among Inventions 1-9 is "a monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain of N-cadherin". However, such antibodies are already disclosed in D1(KIM et al.). Thus, the common technical feature is not considered to contribute over the prior art as a whole, and the present application does not meet the requirements of unity of invention (Rule 13.1 PCT).

Since all searchable claims could be searched without extra effort, an opinion will be formulated for the subject-matter of all inventions.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Cláusula 18 y Normas 43 y 44 del PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                     |                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Referencia de<br>Archivo del<br>Solicitante o<br>agente: 2307K-<br>1934-1                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>PARA REALIZAR</b><br><br><b>OTROS</b><br><br><b>TRAMITES</b>                                     | Véase el Formulario<br>PCT/ISA/220 y, cuando<br>corresponda, del punto 5 a<br>continuación.      |
| Solicitud de<br>Patente<br>Internacional N°:<br>PCT/US2009/063881                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Fecha<br>Presentación<br>Internacional<br>(día/mes/año): 10 de<br>noviembre de 2009<br>(10-11-2009) | Fecha de Prioridad<br>(Más antigua)<br>(día/mes/año): 10 de<br>noviembre de 2008<br>(10-11-2008) |
| Solicitante: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA y<br>otros                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                     |                                                                                                  |
| Este informe de búsqueda internacional ha sido preparado por<br>esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al<br>solicitante conforme a la Cláusula 18. Se transmite una copia<br>del mismo a la Oficina Internacional.<br><br>Este informe de búsqueda internacional consta de <u>7</u> páginas.<br>[ ] 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:

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. 15.

☒ 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<br>INTERNACIONAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Solicitud de Patente Internacional N°<br>PCT/US2009/063881 |
| <b>Casillero N° II. Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Continuación del punto 2 de la página 1).</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                            |
| <p>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:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br/>porque se relacionan con un objeto que no se requiere que busque esta Autoridad, a saber:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br/>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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br/>porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con la segunda y tercera oraciones de la Norma 6.4(a).</p> |                                                            |
| <b>Casillero N° III. Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la página 1)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| <p>Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varias invenciones en esta solicitud de patente internacional, a</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                            |

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/US2009/063881

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO:

**C07K 16/18(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)1, C12N  
15/13(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)

C07K 16/18; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/567

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):<br><br>eKOMPASS(KIPO interna), Delphion, Pubmed |                                                                                                                                      |                                     |
| C. Documentos Considerados Relevantes                                                                                                                                                              |                                                                                                                                      |                                     |
| Categoría*                                                                                                                                                                                         | Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes                                                                 | Relevante para la reivindicación N° |
| X                                                                                                                                                                                                  | KIM, J.-B. et al. 'Repetición extracelular de N-Cadherina 4 media la transición de epitelial a mesenquimal y la motilidad aumentada' | 1-3                                 |
| A                                                                                                                                                                                                  | Diario de Biología Celular. Vol. 151(6), págs. 1193-1205 (11 de diciembre de 2000)<br><br>Véase pág. 1201, columna izquierda.        | 7-27                                |
| X                                                                                                                                                                                                  | HARRISON, O. J. et al. "El mecanismo de la adhesión a las células por cadherinas clásicas: el papel del dominio 1"                   | 4-6                                 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <p>Diario de Ciencia Celular.</p> <p>Volumen 118(Pt.4), pags. 711-721 (25 de enero de 2005)</p> <p>Véase pag. 715, columna izquierda.</p>                                                                                     | 7-27 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <p>TRAN, N. L. et al. 'Expresión de N-cadherina en líneas de células de carcinoma de próstata humano.'</p> <p>Diario Estadounidense de Patología. Vol. 155(3), pags. 787-798 (Septiembre de 1999)</p> <p>Véase el resumen</p> | 7-27 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <p>US 6682901 B2 (BLASCHUK; OREST W. Et al.) 27 de enero de 2004</p> <p>Véase el resumen.</p>                                                                                                                                 | 7-27 |
| <p>[x] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C.</p> <p>[x] Véase el anexo de familia de patentes</p>                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                               |      |
| <p>* Categorías especiales de "T": documento posterior</p> <p>documentos citados: publicado con posterioridad a</p> <p>"A": documento que define el la fecha de presentación</p> <p>estado general del arte que no internacional o a la fecha de</p> <p>se considera de particular prioridad y que no está en</p> |                                                                                                                                                                                                                               |      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Fecha de envío del informe de efectiva de la búsqueda búsqueda internacional |

|                                                              |
|--------------------------------------------------------------|
| internacional                                                |
| 20 de julio de 2010 (20-07- 22 de julio de 2010 (22-07-2010) |
| Nombre y domicilio para Funcionario Autorizado:              |
| correspondencia de la ISA/KR KIM, JI YUN                     |
| Oficina de la Propiedad N° Telefónico: 82-42-481-8288        |
| Intelectual de Corea                                         |
| Complejo Gubernamental-                                      |
| Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-                                 |
| gu, Daejeon 302-701, República                               |
| de Corea                                                     |
| N° de Fax 82-42-472-7140                                     |

Formulario PCT/ISA/210 (página dos) (julio de 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA  
INTERNACIONAL

Solicitud de Patente Internacional N°  
PCT/US2009/063881

| C. Documentos Considerados Relevantes |                                                                                                                     |                                     |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Categoría*                            | Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes                                                | Relevante para la reivindicación N° |
| A                                     | ALEXANDER, N. R. 'Expresión de gen de N-cadherina en carcinoma de próstata es modulado por la translocación nuclear | 1-27                                |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |      |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| A | dependiente de integrina de Twistl. <sup>1</sup> Investigación en Cáncer. Vol. 66(7), pags 3365-3369 (1 de abril de 2006). Véase el resumen.<br><br>WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 de septiembre de 2007. Véase el resumen. | 1-27 |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

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

| <p>INFORME DE BÚSQUEDA</p> <p>INTERNACIONAL</p> <p>Información sobre</p> <p>miembros de familia de</p> <p>patentes</p> | <p>Solicitud de Patente Internacional N°</p> <p>PCT/US2009/063881</p>                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Documento de Fecha</p> <p>patente citado publicación</p> <p>en el informe de</p> <p>búsqueda</p>                    | <p>de Miembro(s) de Fecha de</p> <p>familia de publicación</p> <p>patentes</p>                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p>US 6682901 82</p> <p>27.01.2004</p>                                                                                 | <p>AU 1999-35906 A1 23.11.1999</p> <p>AU 1999-35906 B2 08.08.2002</p> <p>AU 1999-35907 A1 23.11.1999</p> <p>AU 1999-35907 B2 03.04.2003</p> <p>AU 2001-272717B2 18.08.2005</p> <p>AU 2001-72717 A1 08.10.2001</p> <p>CA 2327530-A1 11.11.1999</p> <p>CA 2328112-A1 11.11.1999</p> <p>CA 2404202-A1 04.10.2001</p> |

|                  |            |
|------------------|------------|
| EP 1075494 A2    | 14.02.2001 |
| EP 1075662 A2    | 14.02.2001 |
| EP 1366076 A2    | 03.12.2003 |
| EP 1970383 A1    | 17.09.2008 |
| JP 2002-513804 A | 14.05.2002 |
| JP 2002-513937 A | 14.05.2002 |
| JP 2002-513937 T | 14.05.2002 |
| JP 2004-504809 A | 19.02.2004 |
| US2002-0123044A1 | 05.09.2002 |
| US2002-0146687A1 | 10.10.2002 |
| US2002-0169106A1 | 14.11.2002 |
| US2003-0082166A1 | 01.05.2003 |
| US2003-0096746A1 | 22.05.2003 |
| US2003-0229199A1 | 11.12.2003 |
| US2004-0229811A1 | 18.11.2004 |
| US2004-0248219A1 | 09.12.2004 |
| US2004-0248220A1 | 09.12.2004 |
| US2005-0203025A1 | 15.09.2005 |
| US2005-0215482A1 | 29.09.2005 |
| US2005-0222037A1 | 06.10.2005 |
| US2006-0118925A1 | 08.06.2006 |
| US2007-0127211A1 | 07.06.2007 |
| US2008-0137300A1 | 12.06.2008 |
| 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 6962969 B2    | 08.11.2005 |
| US 7481999 B2    | 27.01.2009 |
| US 7554190 B2    | 30.06.2009 |
| US 7663227 B2    | 16.02.2010 |
| US 7755184 B2    | 13.07.2010 |
| WO 01-72956 A2   | 04.10.2001 |
| WO 01-72956 A3   | 04.10.2001 |
| WO 2008-073707A2 | 19.06.2008 |
| WO 2008-073707A3 | 19.06.2008 |
| WO 2009-100374A1 | 13.08.2009 |

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

|                                                                                                         |            |                                                                |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------|----------------|
| INFORME DE BÚSQUEDA<br><br>INTERNACIONAL<br><br>Información sobre<br>miembros de familia de<br>patentes |            | Solicitud de Patente Internacional N°<br><br>PCT/US2009/063881 |                |
| Documento                                                                                               | de Fecha   | de Miembro(s)                                                  | de Fecha       |
| patente                                                                                                 | citado     | publicación                                                    | familia        |
| en el informe de                                                                                        |            | patentes                                                       | de publicación |
| búsqueda                                                                                                |            |                                                                |                |
|                                                                                                         |            | WO 99-57149 A2                                                 | 11.11.1999     |
|                                                                                                         |            | WO 99-57565 A2                                                 | 11.11.1999     |
|                                                                                                         |            | WO 99-57565 A3                                                 | 11.11.1999     |
|                                                                                                         |            | WO 99-57565A3                                                  | 30.03.2000     |
| WO 2007-109347 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 A                                               | 27.08.2009     |
|                                                                                                         |            | 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                                              | 27.09.2007     |
|                                                                                                         |            | WO 2007-109347 A3                                              | 16.10.2008     |

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

INFORME DE BÚSQUEDA  
INTERNACIONAL

Solicitud de Patente Internacional N°  
PCT/US2009/063881

Las invenciones separadas que halló la Autoridad de Búsqueda son las siguientes:

Invención 1: Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él capaz de unirse al dominio extracelular 4 de N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 1. (reivindicaciones 1-3; reivindicaciones 7-27 parcialmente)

Invención 2: Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él capaz de unirse al dominio extracelular 1-3 de N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 2 (4-27 parcialmente)

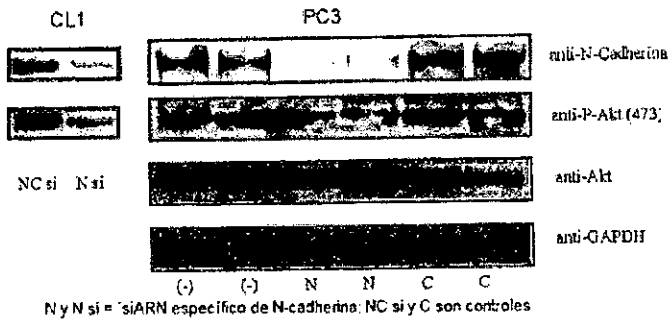
Invenciones 3-9: como en la invención 2, pero en relación con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9. (4-27 parcialmente).

La característica técnica común entre las invenciones 1-9 es "un anticuerpo monoclonal o un fragmento de él capaz de unirse al dominio extracelular de N-cadherina". Sin embargo, dichos anticuerpos también se revelan en D1(KIM et al). Es decir, la característica técnica común no se considera que contribuya

|                                                                                                                                                                                                   |                               |                                                                                                                                                                             |              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|  <b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                 |                               | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |              |
| (21) N° de solicitud:<br><br>22) Fecha de solicitud: 08-06-2011                                                                                                                                   |                               | (51) Int Cl:<br><br>(71) Solicitante(s) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA                                                                                         |              |
| (30) Prioridad SI                                                                                                                                                                                 | (31) No. Priodidad 61/113,042 | (32) Fecha 10/11/2008                                                                                                                                                       | (33) País US |
|                                                                                                                                                                                                   |                               | (72) Inventor(es) 1.- REITER, Robert E<br>2.- LEPIN, Eric<br>3.- WU, Anna M                                                                                                 |              |
|                                                                                                                                                                                                   |                               | (74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ                                                                                                                               |              |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional:<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: 10-11-2009<br>No. de solicitud: PCT/US2009/063881 |                               | (87) Publicación internacional<br>Fecha: 14/05/2010<br>N° publicación: WO 2010/054377 A9                                                                                    |              |
| (54) Titulo: ANTICUERPOS COMPLETAMENTE HUMANOS CONTRA N-CADHERINA.                                                                                                                                |                               |                                                                                                                                                                             |              |

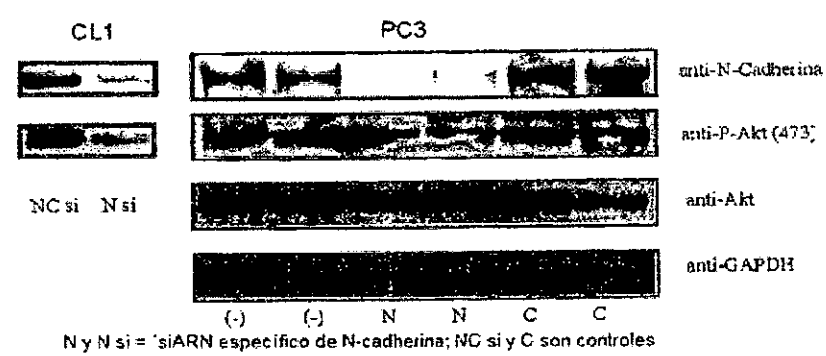
Reivindicación(es):

El knockdown de N-cadherina conduce a una regulación hacia abajo de Akt activado



1. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos capaces de ligarse con el dominio extracelular 4 de N-cadherina, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento es un scFv.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento es un diacuerpo.

El knockdown de N-cadherina conduce a una regulación hacia abajo de Akt activado





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-070983-00000-0000

Fecha: 2011-06-08 15:38:50

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Fotos: 247

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                              |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
MAYA RODRIGUEZ CARLOS ORLANDO

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 11 70983          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2009/063881 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 10/06/2011        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 |                   |

**010981**

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. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a lo dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.
2. 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.
3. 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.

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo

Continúa en la página siguiente...

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070  
Call Center 5920400. Línea 01800-910165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. Colombia

Radicación No.: 11 70983

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.

  
CARLOS DANIEL LEMUS GIRALDO

Profesional Universitario 2044-09 (P) con asignación de funciones  
de la Dirección de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 11 5 JUL. 2011  
adpall