



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 690**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99909962 .5**  
96 Fecha de presentación : **12.03.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1062333**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2000**

54 Título: **Genes asociados con el condrosarcoma.**

30 Prioridad: **13.03.1998 US 42225**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **RHODE ISLAND HOSPITAL**  
**593 Eddy Street**  
**Providence, Rhode Island 02903, US**

72 Inventor/es: **Terek, Richard, M.**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 317 690 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Genes asociados con el condrosarcoma.

5 **Antecedentes de la invención**

La invención se refiere a tumores malignos de hueso.

10 El condrosarcoma, que normalmente aparece al final de la edad adulta y en la vejez, es la segunda forma más común de tumor maligno de hueso. Los tumores de condrosarcoma convencionales se clasifican de la fase I a la fase III, siendo la fase III la más avanzada. Además del condrosarcoma convencional, hay otros tipos de condrosarcomas con características distintivas: condrosarcoma mixoide, mesenquimatoso, de células claras y desdiferenciado (célula fusiforme).

15 El diagnóstico y clasificación del condrosarcoma han sido problemáticos. Por ejemplo, los criterios usados para distinguir el encondroma benigno del condrosarcoma de grado bajo incluyen parámetros que son difíciles de cuantificar tales como una mayor celularidad y células binucleadas más que ocasionales. Los criterios histológicos no son absolutos, y el diagnóstico se hace con frecuencia teniendo en cuenta características clínicas tales como el dolor, velocidad de crecimiento, localización y características radiológicas. Además, la localización del tumor puede afectar a la  
20 evaluación clínica. Por ejemplo, lesiones en la mano pueden aparecer como histológicamente agresivas pero comportarse de forma benigna. Por el contrario, lesiones que se encuentran en la pelvis es muy probable que representen un tumor maligno a pesar de un aspecto histológico relativamente inocuo. A pesar de los intentos de integrar los criterios clinicopatológicos, no ha sido posible predecir qué tumores extenderán la metástasis o reaparecerán.

25 Rosier y col., *J. Surg. Oncol.* 65:95-105 (1997) describen MDR-1 y su producto de proteína, la P-glicoproteína.

Nakanishi y col., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 234:206-10 (1997) describen la expresión de la secuencia marcadora correspondiente al factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF).

30 Gloeckner y col., Base de datos EMBL entrada HSAF2996, nº de acceso AF002996 (1997), describen una secuencia genómica alrededor del gen CP1, pero sin hacer referencia a células de condrosarcoma.

35 Liang y col., *Science* 257(5072):967-71 (1992) describen procedimientos de presentación diferencial de ARNm que se pueden usar para aislar genes, pero no proporcionan ningún ejemplo del uso de los procedimientos para estudiar, detectar y/o identificar células de condrosarcoma.

**Resumen de la invención**

40 La invención se basa en el descubrimiento de un nuevo gen que se expresa de forma diferencial en células de condrosarcoma.

Por consiguiente la invención proporciona:

45 (A) una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de ID SEC N°: 1 y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con la de células normales es indicativa de condrosarcoma;

50 (B) una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de ID SEC N°: 2 y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con la de células normales es indicativa de condrosarcoma; y

55 (C) una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico consiste en: la secuencia de nucleótidos de ID SEC N°: 1 o una variante degenerada de la misma, en la que dicha variante degenerada codifica un polipéptido que consiste en al menos 50 aminoácidos de la secuencia de ID SEC N°: 2 y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con la de células normales es indicativa de condrosarcoma.

60 La invención, por lo tanto, presenta un ácido nucleico aislado (p. ej., ADN genómico, ADNc o ADN sintético) que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA) tal como CSA-1 humano. La expresión "asociado a condrosarcoma" se refiere a la propiedad de expresión diferencial en células de condrosarcoma comparado con células de cartílago normales. Por ejemplo, un producto génico CSA se expresa con un nivel mayor o menor detectable comparado con el nivel al que se expresa en células de cartílago normales. Un producto génico CSA puede expresarse sólo en células de condrosarcoma (y no en células de cartílago normales).

65 La molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 80% a la secuencia de aminoácidos de CSA-1 (ID SEC N°: 2). Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos de ID SEC N°: 1 o una

## ES 2 317 690 T3

variante degenerada de la misma. Por ejemplo, el ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos de ID SEC N°: 3. La invención también incluye una molécula de ácido nucleico que contiene una cadena que hibrida en condiciones muy restrictivas con un ADN que tiene la secuencia de ID SEC N°: 1, o su complementaria. Un ADN sustancialmente puro que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia (preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, y lo más preferiblemente al menos un 90%) con el ID SEC N°: 1, y que codifica un polipéptido que tiene el patrón diferencial de expresión de un polipéptido CSA-1, también queda dentro del alcance de la invención. Para la expresión de un polipéptido CSA, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CSA está operativamente unida a secuencias reguladoras, p. ej., un promotor.

La invención también incluye un polipéptido CSA sustancialmente puro tal como CSA-1 humano o un fragmento del mismo. Los fragmentos de CSA-1, p.ej., un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 8, son útiles como inmunógenos para aumentar los anticuerpos anti-CSA. El polipéptido CSA preferiblemente contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 2. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es un 75%, 85%, 95%, 98% y lo más preferiblemente 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 2. Una célula que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CSA también queda dentro del alcance de la invención, así como un procedimiento para preparar un polipéptido CSA. Dicho procedimiento puede implicar las siguientes etapas: (a) proporcionar una célula que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CSA, y (b) cultivarla en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico.

Por “molécula de ácido nucleico aislada” se entiende una molécula de ácido nucleico que no contiene los genes que, en el genoma natural del organismo, flanquea un gen *csa*. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus replicante autónomo; o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota; o que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADNc genómico producido mediante PCR o digestión con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. La expresión también incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica la secuencia del polipéptido adicional. La expresión excluye segmentos largos de ADN genómico, p. ej., tales como los presentes en clones cósmidos, que contienen un gen de interés, p. ej., un gen *csa*, flanqueado por uno o más de otros genes que lo flanquean de forma natural en un genoma natural.

Las moléculas de ácido nucleico incluyen tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico y ADN sintético (p. ej., sintetizado químicamente). Si es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser una cadena homocatenaria o una cadena antisentido. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota en un sitio distinto del que es su sitio natural; o que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o digestión por endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica la secuencia de polipéptido adicional.

La hibridación se lleva a cabo usando técnicas estándar tales como las descritas en Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, (1989). “Condiciones restrictivas altas” se refiere a condiciones de hibridación de ADN y lavado caracterizadas por temperatura alta y concentración salina baja, p. ej., condiciones de lavado de 65°C con una concentración salina de aproximadamente 0,1 X SSC. Condiciones de restricción de “bajas” a “moderadas” se refiere a condiciones de hibridación del ADN y lavado caracterizadas por temperatura baja y concentración salina alta, p. ej. condiciones de lavado menores de 60°C con una concentración salina de al menos 1,0 X SSC. Por ejemplo, condiciones de restricción altas pueden incluir hibridación a aproximadamente 42°C y formamida aproximadamente al 50%; un primer lavado a aproximadamente 65°C, aproximadamente 2 X SSC y SDS al 1%; seguido de un segundo lavado a aproximadamente 65°C y aproximadamente 0,1% x SSC. Las condiciones de restricción más bajas adecuadas para detectar secuencias de ADN que tienen aproximadamente un 50% de identidad de secuencia con el gen *csa-1* se detectan, por ejemplo, por hibridación a aproximadamente 42°C en ausencia de formamida; un primer lavado a aproximadamente 42°C, aproximadamente 6 X SSC, y aproximadamente SDS al 1%; y un segundo lavado a aproximadamente 50°C, aproximadamente 6 x SSC, y aproximadamente SDS al 1%.

Cuando se dice que un polipéptido o molécula de ácido nucleico particular tiene un porcentaje de identidad específico con un polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia de una longitud definida, el porcentaje de identidad es respecto al polipéptido o la molécula de ácido nucleico de referencia. Por lo tanto, un péptido que es un 50% idéntico a un polipéptido de referencia que tiene 100 aminoácidos de longitud puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que es completamente idéntico a una porción de 50 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. También puede ser un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud que es un 50% idéntico al polipéptido de referencia a lo largo de su longitud completa. Por supuesto, muchos otros polipéptidos cumplirán los mismos criterios. Se aplica la misma norma para las moléculas de ácido nucleico.

Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia en general será de al menos 16 aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente de al menos 25 aminoácidos, y lo más preferiblemente 35 aminoácidos, 50 aminoácidos o 100 aminoácidos. Para ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia en general será de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 75 nucleótidos, y lo más preferiblemente 100 nucleótidos o 300 nucleótidos.

## ES 2 317 690 T3

En el caso de secuencias de polipéptidos que son idénticas en menos del 100% a una secuencia de referencia, las posiciones no idénticas son, preferiblemente pero no necesariamente, sustituciones conservativas para la secuencia de referencia. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

La identidad de secuencia se mide usando un programa de análisis de secuencia (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705), con los parámetros por defecto especificados en el mismo.

Por “promotor” se entiende una secuencia de ADN mínima suficiente para dirigir la transcripción. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden estar acoplados a otras secuencias o “elementos” reguladores que hacen la expresión de gen dependiente de promotor específico del tipo de célula, específico de tejido o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar situados en la región 5' ó 3' del gen nativo, o dentro de un intrón. El ADN que codifica un polipéptido CSA puede estar operativamente unido a dichas secuencias reguladoras para la expresión del polipéptido en células procariotas o eucariotas. Por “operativamente unido” se entiende que una secuencia codificadora y una(s) secuencia(s) reguladora(s) están conectadas de forma que permitan la expresión génica cuando las moléculas adecuadas (p. ej., proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la(s) secuencia(s) reguladora(s).

Una proteína no tiene sustancialmente componentes asociados naturales cuando se separa de los contaminantes que la acompañan en su estado natural, (proteínas y otras moléculas orgánicas naturales) que la acompañan de forma natural. Normalmente, el polipéptido está sustancialmente puro cuando constituye al menos un 60% en peso de la proteína en la preparación. Preferiblemente, la proteína en la preparación constituye al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90% y lo más preferiblemente al menos un 99% en peso, del polipéptido CSA-1. Se puede obtener un polipéptido CSA-1 sustancialmente puro, por ejemplo, por extracción de una fuente natural (p. ej., una célula de condrosarcoma); por expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido CSA-1; o por síntesis química de la proteína. La pureza se puede medir por cualquier procedimiento adecuado, p. ej., cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC. Por consiguiente, los polipéptidos sustancialmente puros incluyen polipéptidos recombinantes derivados de un eucariota pero producidos en *E. coli* u otro procariota o en un eucariota distinto del que se obtuvo originalmente el polipéptido.

La invención también presenta especies que se unen al polipéptido CSA, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido CSA, p. ej. un anticuerpo específico de CSA-1. Los anticuerpos específicos para un polipéptido CSA son útiles para diagnosticar el condrosarcoma.

El condrosarcoma se diagnostica midiendo la expresión del gen *csa* en muestras de tejido de paciente. La expresión de CSA-1 se puede detectar en células de condrosarcoma pero no en células normales (o en algunos otros tipos de tumores que se ensayaron). Por lo tanto, el uso de polipéptidos CSA y de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido CSA en el diagnóstico y clasificación del condrosarcoma también queda dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un procedimiento para diagnosticar la presencia de una célula de condrosarcoma en una muestra de tejido, se lleva a cabo midiendo la expresión de un gen *csa*, p. ej., un gen que codifica CSA-1, en la muestra de tejido y en una muestra de control tal como una célula de cartílago no neoplásica normal. Un aumento de la expresión del gen *csa* en la muestra de tejido, comparado con la muestra de control, indica que la muestra de tejido contiene una célula de condrosarcoma. Un procedimiento para clasificar un tumor de condrosarcoma se puede llevar a cabo determinando el nivel de expresión del gen *csa-1* en una muestra de control y compararlo con el nivel de expresión de gen *csa-1* en una muestra de control. El nivel de expresión en la muestra de ensayo comparado con la muestra de control es directamente proporcional al grado o fase del tumor, es decir, cuanto mayor es el nivel de expresión de un gen *csa* más avanzada es la fase del tumor.

Además de evaluar muestras de biopsia de tejido para la expresión del gen *csa*, la expresión del gen *csa* se puede detectar *in vivo*. Por ejemplo, se puede administrar a un paciente una cantidad eficaz para el diagnóstico de una especie de unión específica a CSA-1 marcada de forma detectable, seguido de la determinación de si la especie se une específicamente a células de cartílago del paciente. La unión de especies de unión a CSA-1, p. ej. un anticuerpo específico para CSA-1, fragmento de anticuerpo o compuesto de unión a CSA-1 que no sea anticuerpo, a las células del paciente, es una indicación de la presencia de condrosarcoma en el paciente. El nivel de unión se correlaciona con el grado del condrosarcoma, es decir, una mayor cantidad de unión comparada con un control normal de tumor de grado bajo conocido indica que el tumor del paciente es de un grado alto. Igualmente, se puede llevar a cabo como sigue un procedimiento para detectar un condrosarcoma progresivo en un paciente: (a) administrar sucesivamente a un paciente que se sospecha que tiene un condrosarcoma una cantidad eficaz para el diagnóstico de una especie de unión específica a CSA-1 marcada de forma detectable (p. ej., un anticuerpo marcado con un radioisótopo o un marcador paramagnético), y (b) comparar la cantidad de la especie que se une a células de cartílago del paciente en cada administración sucesiva para detectar un aumento de la unión de la especie de unión a lo largo del tiempo. Un aumento de la unión a lo largo del tiempo es una indicación de condrosarcoma progresivo en dicho paciente. Cuando la etapa de detección es cuantitativa, la cantidad de unión se correlacionaría con y permitiría el diagnóstico de la gravedad de la enfermedad. Un procedimiento de diagnóstico llevado a cabo múltiples veces mediante la administración repetida a intervalos de tiempo espaciados de la especie de unión marcada al paciente, con las administraciones espaciadas p. ej., un día, una semana, un mes, varios meses o incluso años, es un procedimiento útil para detectar el progreso de la enfermedad en el paciente.

## ES 2 317 690 T3

Los compuestos capaces de inhibir la expresión de un polipéptido CSA pueden ser terapéuticamente útiles para tratar el condrosarcoma. Por consiguiente, la invención incluye un procedimiento de cribado de un compuesto candidato para identificar un compuesto capaz de inhibir la expresión de un polipéptido CSA, p. ej. CSA-1, (a) proporcionando una célula de condrosarcoma que expresa un polipéptido CSA, (b) poniendo en contacto la célula con el compuesto candidato, y (c) determinando la cantidad de expresión del polipéptido CSA por la célula. Una disminución de la cantidad de expresión del polipéptido CSA en presencia del compuesto candidato comparado con aquella en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto inhibe la expresión del polipéptido CSA.

La invención también incluye un procedimiento para inhibir la expresión o actividad de CSA-1. Los antagonistas adecuados incluyen una molécula de ácido nucleico que interfiere con la transcripción o traducción de *csa-1*, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido y ribozimas. También están incluidos anticuerpos u otras moléculas antagonistas adecuadas que se unen específicamente al polipéptido CSA-1 y “neutralizan” su actividad.

Además de los procedimientos de diagnóstico, como se han descrito antes, la presente invención abarca procedimientos y composiciones para evaluar el tratamiento adecuado y la eficacia del tratamiento de tumores malignos asociados con la expresión de *csa-1*. Por ejemplo, el *csa-1* se puede usar como una sonda para clasificar las células en términos de su nivel de expresión de *csa-1*, o como cebadores para el diagnóstico por análisis de PCR, en el que se pueden detectar mutaciones y la variación alélica de *csa-1*.

La invención también incluye animales no humanos transgénicos que expresan CSA-1 humano y mamíferos no humanos transgénicos con una mutación nula en su gen de CSA-1 endógeno. Estos animales pueden servir como modelos nuevos y útiles del condrosarcoma. La invención también incluye un mamífero no humano transgénico, p. ej., un roedor tal como un ratón, cuyas células germinales y células somáticas contienen una mutación nula, p. ej., una delección, en el ADN que codifica un gen *csa*. Por “mutación nula” se entiende una alteración en la secuencia de nucleótidos que convierte al gen en incapaz de expresar un producto proteínico funcional. La mutación podría ser en regiones reguladoras de *csa* o en la secuencia codificadora. Puede, por ejemplo, introducir un codón de parada que da como resultado la producción de un producto génico truncado e inactivo, o puede ser una delección de toda o una parte sustancial de la secuencia codificadora.

La invención también presenta un ácido nucleico aislado (p. ej., ADN genómico, ADNc o ADN sintético) que codifica un polipéptido asociado a cartílago (CAA) tal como CAA-1. La expresión “asociado a cartílago” se refiere a la propiedad de la expresión diferencial en células del linaje de cartílago comparado con células de otras especificidades de tejidos. Por ejemplo, un producto génico CAA se expresa en células de cartílago normales y en células de condrosarcoma, pero no en células de otras especificidades de tejidos u otros tipos de tumores.

La molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 80% a la secuencia de aminoácidos de CAA-1 (ID SEC N°: 7). Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos del ID SEC N°: 6 o una variante degenerada de la misma. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener la secuencia de nucleótidos del ID SEC N°: 5. La invención también incluye una molécula de ácido nucleico que contiene una cadena que hibrida en condiciones de restricción altas con un ADN que tiene la secuencia del ID SEC N°: 6, o la complementaria de la misma. Un ADN sustancialmente puro que tiene al menos 50% de identidad de secuencia (preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 90%) con el ID SEC N°: 7, y que codifica un polipéptido que tiene la actividad de CAA-1. Por actividad de CAA-1 se entiende la inhibición de la regulación positiva inducida por el interferón gamma de antígenos HLA clase II. Para la expresión de un polipéptido CAA, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CAA está operativamente unida a secuencias reguladoras, p. ej. un promotor.

La invención también incluye un polipéptido CAA sustancialmente puro tal como CAA-1 humano o un fragmento del mismo. El polipéptido CAA-1 preferiblemente contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 50% a la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 7. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica en un 75%, 85%, 95%, 98% y lo más preferiblemente 100% a la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 7. Una célula que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CAA también queda dentro del alcance de la invención, así como un procedimiento para preparar un polipéptido CAA. Dicho procedimiento implica las siguientes etapas: (a) proporcionar una célula que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido CAA, y (b) cultivarla en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico.

La invención también presenta una especie que se une al polipéptido CAA, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido CAA, p. ej., un anticuerpo específico de CAA-1. Los anticuerpos específicos para un polipéptido de CAA son útiles para determinar la especificidad de tejido y para aplicaciones terapéuticas, p. ej., para inhibir la actividad de CAA-1.

Los compuestos capaces de inhibir la expresión de un polipéptido CAA pueden ser terapéuticamente útiles para tratar afecciones, p. ej., artritis reumatoide, asociadas con la inflamación de articulaciones indeseada o patológica. Por consiguiente, la invención incluye un procedimiento de cribado de un compuesto candidato para identificar un compuesto capaz de inhibir la expresión de un polipéptido CAA, p. ej. CAA-1, (a) proporcionando una célula que expresa un polipéptido CAA, (b) poniendo en contacto la célula con el compuesto candidato, y (c) determinando la cantidad de expresión del polipéptido CAA por la célula. Una disminución de la cantidad de expresión del polipéptido

CAA en presencia del compuesto candidato, comparada con la producida en ausencia del compuesto candidato, indica que el compuesto inhibe la expresión del polipéptido CAA. Un procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe la actividad de CAA-1 se puede llevar a cabo como sigue: (a) se proporciona una célula que expresa un polipéptido CAA, (b) se pone en contacto la célula con el compuesto candidato, y (c) se determina la cantidad de expresión de HLA II por la célula. Una disminución de la cantidad de expresión de HLA II en presencia del compuesto candidato comparada con esta en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto inhibe la expresión de HLA II en la célula.

Los procedimientos para tratar la inflamación indeseada tales como la asociada con la artritis reumatoide y otras artropatías inflamatorias también quedan dentro del alcance de la invención. Dicho procedimiento se puede llevar a cabo administrando a un mamífero que necesite dicha terapia, p. ej., un paciente que padece artritis reumatoide u otra artropatía inflamatoria, una cantidad eficaz de un polipéptido CAA-1. Por ejemplo, el péptido se administra localmente en el sitio de una lesión reumatoide para reducir la inflamación e hinchamiento locales.

La invención también incluye un mamífero no humano transgénico que expresa CAA-1 humano y un mamífero no humano transgénico con una mutación nula en su gen CAA-1 endógeno.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de sus realizaciones preferidas y a partir de las reivindicaciones.

### Descripción detallada

Hasta la fecha no se ha asociado una anomalía genética consistente con el condrosarcoma. Los tumores son heterogéneos y a menudo tienen numerosas anomalías en la expresión de genes. Los siguientes ejemplos proporcionan pruebas de un nuevo gen, *csa-1*, que se expresa en una línea celular de condrosarcoma humano y en neoplasmas cartilagosos, pero no en el cartílago normal. El nivel de expresión de un polipéptido CSA-1 se correlaciona con el grado histológico del neoplasma, es decir, un aumento de la expresión indica un tumor de grado más alto. La detección de un producto génico CSA-1 o el transcrito de *csa-1* es un medio para distinguir una célula neoplásica de una célula de cartílago normal.

Los polipéptidos CSA y polipéptidos CAA se pueden usar terapéuticamente. Por ejemplo, un polipéptido CAA tal como CAA-1 puede funcionar como un supresor de tumor. También se puede administrar el polipéptido CAA-1 a pacientes para reducir la inflamación indeseada tal como la inflamación de articulaciones en la artritis reumatoide.

El CSA-1 tiene una función en la potenciación de la condrogénesis asociada con el condrosarcoma. La transfección de líneas celulares normales o sin expresión con vectores que promueven niveles altos de expresión de un polipéptido CSA, p. ej., CSA-1, seguido de la transformación de una línea celular de grado bajo en una línea celular de grado alto, indica que la expresión de CSA potencia el crecimiento neoplásico. Los inhibidores de la expresión de CSA-1 pueden ralentizar o inhibir el crecimiento neoplásico. La transformación y clasificación de las células transformadas se evalúa examinando cambios en la morfología, proliferación, adhesión y capacidad de invasión.

Se han clonado dos genes nuevos. CSA-1 se expresa en una línea de células tumorales y también en algún condrosarcoma de grado alto, pero no en el cartílago normal, o tumores de grado bajo o intermedio. Un segundo gen, CAA-1, se expresa en el cartílago normal y en una línea de células tumorales de grado intermedio, y como mensajes de tamaño alternativo en una línea celular de grado alto.

### Ejemplo 1

#### Clonación de genes *csa*

Se cultivaron líneas celulares de condrosarcoma obtenidas de condrosarcomas humanos de grado I, II y III alternativamente en cultivos de monocapas y en cultivos en suspensión de agarosa usando procedimientos estándar. El ARN celular total se aisló usando técnicas estándar. Se analizaron tres líneas celulares de condrosarcoma humano diferentes (AQ, tumor en fase II; FS, tumor en fase II y MW, tumor en fase I) y cartílago articular normal obtenido de muestras de amputación.

Usando la técnica de presentación diferencial de ARNm, una técnica que amplifica sistemáticamente los ARNm mediante RT-PCR con diferentes grupos de cebadores arbitrarios 5' y cebadores de anclaje oligo-dT 3', se compararon los patrones de ARNm de células y de tipos de células diferentes. Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturizante para presentar los patrones de ARNm que distinguen un tipo de célula de otro. Las bandas que se separaron por electroforesis en gel representan los extremos 3' de los ADNc. Por lo tanto, una banda que está presente en un tipo de célula, p. ej., una línea de células de condrosarcoma o tejido de biopsia de condrosarcoma, pero no en el tejido de cartílago normal o en tejido no cartilaginoso, sugiere que el gen se expresa de forma diferencial en condrosarcomas.

Se generó ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador oligo-dT (TTTTTTTTTTTTTMMN (ID SEC N°: 4), en el que M puede ser C, G o A; N puede ser C, G, A o T). Después se llevó a cabo una reacción de PCR por

## ES 2 317 690 T3

triplicado con el mismo cebador oligo-dT y un segundo cebador de la pareja de diez pares de bases aleatorio (RNAmapping, GenHunterCorp., Brookline, MA). Esta combinación de cebadores amplificó aproximadamente 100 ADNc de 100-500 pares de bases de longitud. Los ADNc se separaron en un gel de secuenciación. Una banda que está presente en una o más líneas celulares de cáncer y ausente en una célula normal puede representar un oncogén que se expresa en la célula de cáncer pero no en la célula normal. A la inversa, una banda que está ausente en una o más líneas celulares de cáncer y está presente en una célula normal puede representar un gen supresor de tumor que no está siendo expresado debido a una mutación o defecto de regulación.

Se eluyó el ADNc de un ARNm expresado de forma diferencial del gel de secuenciación y se volvió a amplificar en una reacción de PCR con los mismos cebadores usados en la reacción de presentación diferencial y se clonó en un vector pCR<sup>TM</sup> II (Invitrogen, San Diego, CA). Se identificaron los ARNm específicos que estaban presentes únicamente en células de condrosarcoma y se clonaron los correspondientes ADNc. Los ADNc se secuenciaron usando los cebadores de secuenciación directos e inversos M13, que flanquean el sitio de clonación del vector pCR<sup>TM</sup>. Algunas secuencias eran idénticas a genes conocidos, p. ej., ciclina D2, una proteína reguladora del ciclo celular, y PTX3, un miembro de la familia de genes pentaxina. Los ADNc nuevos, es decir, los que no tienen similitud de secuencia con genes conocidos, se usaron para la transferencia Northern para confirmar que el gen correspondiente se expresa diferencialmente en células de condrosarcoma. Se usaron veinte de dichas sondas de ADNc para cribar la expresión diferencial del ARNm y se secuenciaron (Tabla 1). Se encontró que un gen nuevo, *csa-1*, se expresaba diferencialmente en células de condrosarcoma comparado con células de cartílago normal y otros tipos de células tales como células de mama, pulmón y colon.

TABLA 1

Clon	Tipo de gel	MW (I)	FS (II)	AQ (III)	NI Cart	
FS1	DD	-	+	-	-	
	N3-0	-	+	+	-	
	N3-1	-	+	+	+	
FS2	DD	-	+	-	-	
	E1	DD	-	-	+	
	N3-2	-	+	+	+	
FS3	N3-3	-	+	+	-	
	DD	+	+	+	-	
	AQ1	DD	-	-	+	-
E2	DD	-	-	-	+	
	AQ3	DD	-	-	+	-
	E6	DD	-	-	-	+
AQ2	DD	-	-	+	-	
	E7	DD	-	-	-	+
	FS10	DD	+	+	+	-
FS11	DD	+	+	+	-	
	AQ6	DD	-	-	+	+
	FS8	DD	+	+	-	+
MW1	DD	+	-	-	-	
	MW2	DD	+	-	-	-
	MW3	DD	+	-	-	-
FS9	DD	-	+	+	+	
	FS10	DD	-	+	-	-
	AQ5	DD	-	+	+	+

DD: Gel de presentación diferencial  
N: Transferencia Northern

## ES 2 317 690 T3

### *Clonación de csa-1*

El gen que codifica CSA-1 se identificó usando la PCR de presentación diferencial como se ha descrito antes. FS8 es una sonda que corresponde a una de las secuencias expresadas diferencialmente identificadas. Como se muestra en la Tabla 1, el gel de presentación diferencial del cual se aisló la sonda FS8 indicaba que este gen no se expresaba en la línea celular AQ. En un ensayo de transferencia Northern, la sonda se hibridaba con un mensaje de aproximadamente 0,85 kb de tamaño en la línea celular FS así como en un condrosarcoma de grado alto. No se detectó mensaje en el cartilago normal, placa de crecimiento bovino, o en condrosarcoma de grado 1 ó 2.

Se encontró que la sonda FS8 (específica para CSA-1), que correspondía al extremo 3' del gen *csa-1*, tenía una longitud de 250 bases. Se usó la amplificación rápida de 5' del ADNc (5' RACE) para clonar el gen de longitud completa. Se sintetizó un cebador específico del gen que es complementario a la sonda, y se usó como un cebador para sintetizar el ADNc usando ARN de la línea celular FS como molde. El ARN se hizo digerir con Rnasa H, y se añadió un cebador para el anclaje al extremo 3' con TdT y dCTP. Se llevó a cabo la PCR usando el cebador para anclaje a 3' y un segundo cebador específico de gen anidado, dando así ADN bicatenario que es una extensión del fragmento de gen del cual se obtuvo la sonda de presentación diferencial. El fragmento generado por 5'RACE se clonó y secuenció.

La expresión de CSA-1 en células de condrosarcoma se localizó en el núcleo de las células mediante inmunotinción usando un anticuerpo policlonal de conejo específico para un polipéptido CSA-1.

Se encontró que la secuencia del ADNc de *csa-1* de longitud completa (Tabla 2) tenía un marco de lectura abierto (ORF) (Tabla 3 y mostrado en negrilla en la Tabla 2) que codifica un producto génico de 52 aminoácidos, CSA-1 (Tabla 4).

TABLA 2

*ADNc DE CSA-1*

```
ACTTCCCTGGGTTACAGCAGGGGTGGAAGTCTTCTCCTGGATGGGGATCCAGA
TGGAGGTGGAGCTGCACCCCTTGTAGAGAATGGCTGCGGGTCCCAGGCCAGGAGCTC
CCTGCAGGGCGGGGGCTCCCACGATCGTATTGACCTCTGGAAGAAGACAGACACTTT
CCCACGGGAGCTCCTCTCCAGCCAGAGCTACACTTGGCAAACCTTTGGTCCTAAATG
ATTATTCACTGAATTGAAGAAATACGGTTTACATATCTTCCAAGTATATATGTAGGG
TTGATTTGGGAAGCAGAACACAGCAGCCAAATTTGCTTGTAATGTCTGCGACTACA
GCCTGCTGGCCTGCCTTC
ACTGTCTTGGGGGAAGCTCGGGGAGACCAGGTGGACTGGAGTAGACTGTGCAGAGAC
ACTGGTCTGGTGAAGATGTCCAGGAAACCACGAGCCTCCAGCCCATTTTCCAACAAC
CACCCATCAACACCAAAGAGGTTCCCAAGACAACCCAGAAGGGAAAAGGGACCCGTC
AAGGAAGTTCAGGAACAAAAGGCTCTCCCTAAAAGACCACCGCTTCAAAAAACCT
GAGGAATGGAGTGGGCCAACACTATCCAGCCACTCTGACCAGCCGAACGAGGAACTC
AATCAAAATGCGCCATAGCAGGACCACAAGGGCAAGGAGACCACCGCCTTCTCCAGT
GCTTCCTTGGGCAGCCAGTAATTCAGGCAAGGCCAGAGACTTCAAGTCTATCTGA
AAAGTCTCCAGAAGTCTAACCCAGATAAAATAGCCAACAGGGTGTAGAGTACGTTTT
ACACCCAAAGGGTAATGCCCATGGTGATGGAAATAAAATGAACATGTTGTAAAATG
AAAAAAAAAA ( ID SEC Nº: 3 )
```

## ES 2 317 690 T3

TABLA 3

*Secuencia codificadora de CSA-1*

5 **ATGGCTGCGGGTCCCAGGCCAGGAGCTCCCTGCAGGGCGGGGGCTCCCACGATCGTA**  
**TTGACCTCTGGAAGAAGACAGACACTTCCCACGGGAGCTCCTCTCCAGCCAGAGCT**  
10 **ACACTTGGCAAACCTTTGGTCCTAAATGATTATTCCTGAATTGAAGAAA ( ID**  
**SEC N°: 1)**

TABLA 4

*Secuencia de aminoácidos de CSA-1*

15 **MAAGPRPGAPCRAGAPTIVLTSGRRQTLSHGSSSPARATLGKPLVLDYSLN ( ID**  
**SEC N°: 2)**

### 25 *Clonación de caa-1*

El gen que codifica CAA-1 también se identificó usando la PCR de presentación diferencial como se ha descrito antes. E1 es una sonda que corresponde a una de las secuencias expresada diferencialmente identificada. Como se muestra en la Tabla 1, E1 se expresaba en cartílago normal, pero no en ninguna de las líneas celulares de condrosarcoma humano ensayadas por la PCR de presentación diferencial. Una transferencia Northern con la sonda E1 mostró la expresión de un mensaje de 2,2 kb en el cartílago articular normal y la línea celular FS. Por el contrario se detectaron 2 transcritos de tamaños alternativos (7,5 kb y 1,2 kb) en la línea celular AQ de grado alto. Estos datos indican que el gen *caa-1* puede dividirse o reorganizarse alternativamente en la línea celular AQ. El patrón de expresión indica que CAA-1 funciona como un gen supresor de tumor.

La expresión de CAA-1 se analizó usando transferencia Northern y RT-PCR en osteoblastos de líneas celulares de condrosarcoma humano, cartílago normal, músculo, condrosarcoma primario y un grupo de tumores y tejidos normales. Se llevó a cabo la transferencia Northern con E1 y con una parte generada con 5' RACE de 1,5 kb del gen como sondas. La PCR se llevó a cabo usando cebadores que amplifican 306 pb del gen *caa*.

La presentación diferencial del ARNm mostró la expresión de un gen en cartílago normal y en las líneas celulares FS y AQ (pero no en la línea celular MW). Se secuenció la sonda de presentación diferencial (E1), se encontró que era novedosa y se usó para análisis de transferencia Northern, que puso de manifiesto un tamaño de mensaje calculado de 2,2 kb en el cartílago normal y FS, pero no en MW, osteoblasto, músculo o placa de crecimiento bovino.

Se llevó a cabo 5'RACE usando cebadores oligonucleótidos complementarios al extremo 5' del clon E1 y dio un fragmento de 1,5 kb. Con el fin de obtener el resto de la parte 5' del gen, se repitió 5' RACE con nuevos cebadores 5' y se clonó un fragmento adicional de 0,5 kb, y se secuenciaron los fragmentos de gen que se superponían.

Se llevó a cabo la transferencia Northern con el fragmento de 1,5 kb y se detectó un mensaje de 2,0 kb en cuatro muestras diferentes del ARN de FS y en un condrosarcoma de grado II (CS) y ARN de FS. El gen de longitud completa tiene 1955 nucleótidos de longitud, que se correlaciona con el tamaño del mensaje visto con transferencia Northern.

55

60

65

ES 2 317 690 T3

TABLA 5  
ADNc de CAA-1

5 CACGCAAAGCAGTGTGGGTTGATTCTGAGGTGCÀCTGTGGGAAAGAGCTTGTGCTG  
CGGTGTTGCTGTTGGAGACTCGATTGTTGGTGACAGCGAAAGAACGATAACAAAATG  
10 CCGGAGCGAGATAGTGAGCCGTTCTCCAACCCTTTGGCCCCGATGGCCACGATGTG  
GATGATCCTCACTCCTTCCACCAATCAAAACTCACCAATGAAGACTTCAGGAAANTN  
NTCATGACCCCCAGGGNTGCACNTACNTNTGCACCACNTTNTAANTNNTNNTCACCAT  
15 GAGATGCCAAGGGAGTACAATGAGGATGAAGACCCAGCTGCACGAAGGAGGAAAAAG  
AAAAGTTATTATGCCAAGCTACGCCAACAAGAAATTGAGAGAGAGAGAGAGCTAGCA  
GAGAAGTACCGGGATCGTGCCAAGGAACGGAGAGATGGAGTGAACAAAGATTATGAA  
20 GAAACCGAGCTTATCAGCACCACAGCTAACTATAGGGCTGTTGGCCCCACTGCTGAG  
GCGGACAAATCAGCTRCAGNNRAGAGAAGACANWINDAHCNAGGAGTCCAAATTCTTG  
GGTGGTGACATGGAACACACCCATTTGGTGAAAGGCTTGGATTTTGNTNTGCTTCHN  
25 AANGTNCGAGCTGAGATTGNCMSCMNANARAAANARGAARANGNNTGATGGNAAAN  
CCCCMGAAGAAACCAAGAAAGATGAGGATCCTGAAAATAAAATTGAATTTAAAACA  
CGTCTGGGCCGCAATGTTTACCGAATGCTTTTTAAGAGCAAAGCATATGAGCGGAAT  
30 GAGTTGTTCTGCGGGCCGCATGGCCTATGTGGTAGACCTGGATGATGAGTATGCT  
GACACAGATATCCCCACCACTCTTATCCCGCAGCAAGGCTGATTGCCCCACCATGGA  
GGCCAGACCACACTGACCACAAATGACATTGTGATTAGCAAGCTGACCCAGATCCT  
35 TTCATACCTGAGGCAGGGAACCCGTAACAAGAAGCTTAAGAAGAAGGATAAAGGGAA  
GCCGGAAGAGAAGAAACCTCCTGAGGCTGACATGAATATTTTTGAAGACATTGGGGA  
TTACGTACCCTCCACAACCAAGACACCTCGGGACAAGGAGCGGGAGAGATATCGGGA  
40 ACGGGAGCGTGATCGGGAAAGAGACAGAGACCGTGACCGAGAGCGAGAGCGAGAACG  
AGATCGGGAACGAGAGCGAGAGCGGGACCGAGAGAGAGAAGAGGAAAAGAAGAGACA  
CAGCTACTTTGAGAAGCCAAAAGTAGATGATGAGCCATGGACGTTGACAAAGGACC  
45 TGGGTCTACCAAGGAGTTGATCAAGTCCATCAATGAAAAGTTTGCTGGGTCTGCTGG  
CTGGGAAGGCACAGAATCGCTGAAGAAGCCAGAAGACAAAAGCAGCTGGGAGATTT  
50 CTTTGGCATGTCCAACAGTTATGCAGAGTGCTACCCAGCCACGATGGATGACATGGC  
TGTGGATAGTGATGAGGAGGTGGATTATAGCAAAATGGACCAGGGTAACAAGAAGGG  
GCCCTTAGGCCGTTGGGACTTTGATACCCAGGAAGAATACAGCGAGTATATGAACAA  
55 CAAAGAAGCTTTGCCCAAGGCTGCATTCCAGTATGGTATCAAAATGTCTGAAGGGCG  
GAAAACCAGGCGCTTCAAGGAAACCAATGACAAAGCAGAGCTTGATCGCCAGTGGAA  
60 GAAGATTAGTGCAATCATTGANGAAGAGGAAGAAGATGGAAGCTGATGGGGTTGAAG  
TCAAAAGACCAAATACTAATCACTAGTTACAACCAGAGATGCTCCACAAGGATATG  
CTCCCCACTGTTTTCTTTCTACAATTTCAAAGGTTGCAAGATGTTTTTTTGTGATG  
65 AATATAAAATTTTATTGTGTAATTAAGTTGTTCCATTAAAATTGGTTAACTTGCTAA  
AAAAAAA ( ID SEC Nº: 5 )

# ES 2 317 690 T3

TABLA 6

*Secuencia codificadora de CAA-1*

5 ATGATGAGTATGCTGACACAGATATCCCCACCACTCTTATCCCGCAGCAAGGCTGAT  
TGCCCCACCATGGAGGCCAGACCACACTGACCACAAATGACATTGTCATTAGCAAG  
10 CTGACCCAGATCCTTTCATACCTGAGGCAGGGAACCCGTAACAAGAAGCTTAAGAAG  
AAGGATAAAGGGAAGCCGGAAGAGAAGAAACCTCCTGAGGCTGACATGAATATTTT  
GAAGACATTGGGGATTACGTACCCTCCACAACCAAGACACCTCGGGACAAGGAGCGG  
15 GAGAGATATCGGGAACGGGAGCGTGATCGGGAAAGAGACAGAGACCGTGACCGAGAG  
CGAGAGCGAGAACGAGATCGGGAACGAGAGCGAGAGCGGGACCGAGAGAGAGAAGAG  
GAAAAGAAGAGACACAGCTACTTTGAGAAGCCAAAAGTAGATGATGAGCCCATGGAC  
20 GTTGACAAAGGACCTGGGTCTACCAAGGAGTTGATCAAGTCCATCAATGAAAAGTTT  
GCTGGGTCTGCTGGCTGGGAAGGCACAGAATCGCTGAAGAAGCCAGAAGACAAAAG  
CAGCTGGGAGATTTCTTTGGCATGTCCAACAGTTATGCAGAGTGCTACCCAGCCACG  
25 ATGGATGACATGGCTGTGGATAGTGATGAGGAGGTGGATTATAGCAAAATGGACCAG  
GGTAACAAGAAGGGCCCTTAGGCCGTTGGGACTTTGATACCCAGGAAGAATACAGC  
GAGTATATGAACAACAAGAAGCTTTGCCCAAGGCTGCATTCCAGTATGGTATCAAA  
30 ATGTCTGAAGGGCGGAAAACCAGGCGCTTCAAGGAAACCAATGACAAAGCAGAGCTT  
GATCGCCAGTGGAAGAAGATTAGTGCAATCATTGANGAAGAGGAAGAAGATGGAAGC  
TGA ( ID SEC N°: 6 )

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 317 690 T3

TABLA 7

*Secuencia de aminoácidos de CAA-1*

5 Met Met Ser Met Leu Thr Gln Ile Ser Pro Pro Leu Leu Ser  
 Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Thr Met Glu Ala Gln Thr Thr  
 Leu Thr Thr Asn Asp Ile Val Ile Ser Lys Leu Thr Gln Ile  
 10 Leu Ser Tyr Leu Arg Gln Gly Thr Arg Asn Lys Lys Leu Lys  
 Lys Lys Asp Lys Gly Lys Pro Glu Glu Lys Lys Pro Pro Glu  
 Ala Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Ile Gly Asp Tyr Val Pro  
 15 Ser Thr Thr Lys Thr Pro Arg Asp Lys Glu Arg Glu Arg Tyr  
 Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Asp Arg Asp Arg Asp  
 20 Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Glu Arg Glu  
 Arg Asp Arg Glu Arg Glu Glu Glu Lys Lys Arg His Ser Tyr  
 Phe Glu Lys Pro Lys Val Asp Asp Glu Pro Met Asp Val Asp  
 25 Lys Gly Pro Gly Ser Thr Lys Glu Leu Ile Lys Ser Ile Asn  
 Glu Lys Phe Ala Gly Ser Ala Gly Trp Glu Gly Thr Glu Ser  
 Leu Lys Lys Pro Glu Asp Lys Lys Gln Leu Gly Asp Phe Phe  
 30 Gly Met Ser Asn Ser Tyr Ala Glu Cys Tyr Pro Ala Thr Met  
 Asp Asp Met Ala Val Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Tyr Ser  
 Lys Met Asp Gln Gly Asn Lys Lys Gly Pro Leu Gly Arg Trp  
 35 Asp Phe Asp Thr Gln Glu Glu Tyr Ser Glu Tyr Met Asn Asn  
 Lys Glu Ala Leu Pro Lys Ala Ala Phe Gln Tyr Gly Ile Lys  
 Met Ser Glu Gly Arg Lys Thr Arg Arg Phe Lys Glu Thr Asn  
 40 Asp Lys Ala Glu Leu Asp Arg Gln Trp Lys Lys Ile Ser Ala  
 Ile Ile Xaa Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ser (ID SEC N°: 7 )

45 El marco de lectura abierto (ORF) más largo previsto es de 942 pb. Este ORF empieza con el segundo codón de inicio en el marco, y va precedido por un ORF más corto de 126 pb. La proteína prevista para el ORF largo es de 314 aminoácidos con un peso molecular de 37 kDa. El mensaje calculado era de 2,1 kb, pero se describieron sólo 756 pb de la secuencia, que era el clon más largo aislado de su biblioteca de ADNc.

50 La expresión de CAA-1 se ha detectado con la PCR en 4/5 de muestras de cartílago normal, 1/2 de condrosarcoma de grado 0, 3/3 de grado I, 3/4 de grado II y 5/5 de grado III. No se detectó expresión en carcinoma de colon, mama, célula renal y gástrico y los tejidos normales correspondientes; sarcoma osteogénico y tejido blando; y tumor de célula gigante.

55 CAA-1 funciona para regular la respuesta inmunitaria. La regulación de una respuesta inmunitaria, p. ej., inflamación, es crítica para la fisiología de la articulación sinovial normal y la vigilancia de tumores. Los antígenos HLA clase II son necesarios para la presentación del antígeno a las células T, y se ha demostrado que el interferón gamma favorece la expresión de HLA clase II en muchas células normales y tumorales diferentes, incluyendo condrocitos y células del revestimiento sinovial. Además, se ha demostrado que los condrocitos funcionan como células presentadoras de antígeno. CAA-1 funciona como una citoquina que inhibe la regulación positiva inducida por interferón gamma de los antígenos HLA de clase II. Por lo tanto, los condrocitos expresan un gen que modula su propia capacidad, así como células alrededor de la sinovia, para funcionar como células presentadoras de antígeno. El tratamiento de una articulación sinovial con un polipéptido CAA-1 disminuye la expresión de antígenos HLA II. Por lo tanto, se puede administrar localmente un polipéptido CAA-1 para reducir una patología, tal como la asociada con la artritis reumatoide y otras artropatías inflamatorias.

## ES 2 317 690 T3

CAA-1 también se expresa en el cartílago neoplásico. CAA-1 inhibe la regulación positiva de HLA clase II inducida por interferón gamma. La expresión de CAA-1 por células tumorales puede ser un mecanismo de escape del inmunorreconocimiento, es decir, la expresión mayor de CAA-1 disminuye la capacidad del hospedante para controlar el crecimiento tumoral mediante mecanismos inmunológicos. El tratamiento del condrosarcoma por inhibición de la expresión de CAA-1 o la función del producto génico CAA-1 potencia la capacidad del sistema inmunitario del hospedante para controlar el crecimiento tumoral por mecanismos inmunológicos.

### Ejemplo 2

#### 10 *Producción y purificación del polipéptido recombinante CSA y CAA*

Para producir polipéptidos recombinantes, se transfecta en una célula ADN que codifica un polipéptido CSA o CAA en un vector de expresión adecuado. Los procedimientos estándar para transfectar células con un ácido nucleico aislado son conocidos para los expertos en biología molecular. Por ejemplo, se pueden transfectar células procariotas o eucariotas en cultivo con el ADN de la invención operativamente unido a secuencias de control de la expresión adecuadas para la expresión de alto nivel en la célula. Dichas células son útiles para producir grandes cantidades de CSA-1 o CAA-1, que se pueden purificar y usar, p. ej., como un producto terapéutico o para aumentar los anticuerpos anti-CSA-1 y CAA-1.

Por ejemplo, el producto génico recombinante puede expresarse como una proteína de fusión y se puede purificar usando un sistema de expresión y purificación disponible en el comercio, p. ej., el sistema de expresión pFLAG (IBI). Los polipéptidos recombinantes se inyectan en un conejo o roedor para producir anticuerpos como se describe a continuación.

### 25 Ejemplo 3

#### *Producción de anticuerpos específicos para polipéptidos CSA o CAA*

Los anticuerpos específicos para polipéptidos CSA se pueden obtener por técnicas conocidas en la materia. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener, por ejemplo, por procedimientos descritos en Ghose y col., *Methods in Enzymology*, Vol. 93, 326-327, 1983. Por ejemplo, se usó un polipéptido CSA-1 (que contiene 23-24 aminoácidos, p. ej. un polipéptido RRQTLSHGSSSPARAC (ID SEC N°: 8)) como un inmunógeno para estimular la producción de anticuerpos policlonales reactivos contra CSA-1 en el antisuero de un conejo. Se pueden usar procedimientos similares para aumentar el anticuerpo en animales tales como cabras, ovejas y roedores.

Los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden obtener por el procedimiento conocido descrito por Milstein y Kohlerin, *Nature*, 256:495-97, 1975, o según la modificación de Gerhard, *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, 1980, páginas 370-371. Los hibridomas se criban para identificar los que producen anticuerpos que son altamente específicos para un polipéptido CSA. Preferiblemente, el anticuerpo tendrá una afinidad de al menos aproximadamente  $10^8$  litros/mol y más preferiblemente, una afinidad de al menos aproximadamente  $10^9$  litros/mol. El uso de dichos anticuerpos monoclonales proporciona un medio para obtener mayor sensibilidad en los ensayos de la presente invención, comparado con el uso de anticuerpos policlonales.

### 45 Ejemplo 4

#### *Animales transgénicos*

Los polipéptidos CSA también pueden expresarse en animales transgénicos. Estos animales representan un sistema modelo para estudiar trastornos que son causados o exacerbados por la expresión aumentada o reducida de un polipéptido CSA, y para el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan la expresión o actividad de un polipéptido CSA.

Un animal que no expresa CSA-1 es útil para estudiar la función de CSA-1. La inmunotinción de embriones de ratón con anticuerpo anti-CSA-1 mostró tinción del precursor musculoesquelético. Un transgén *csa-1* con una mutación nula da como resultado un animal que no expresa el gen CSA-1, un estado que puede conducir a anomalías del desarrollo puesto que algunos genes expresados por tumores también se expresan durante el desarrollo embrionológico normal.

Alternativamente, un animal transgénico que sobreexpresa CSA-1 es útil para estudiar el condrosarcoma en desarrollo. Dicho animal sería una herramienta útil para evaluar el tratamiento de este tumor.

Los animales transgénicos pueden ser animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares), roedores (tales como ratas, cobayos y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés) y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Se prefieren especialmente los ratones transgénicos.

Se puede usar cualquier técnica conocida en la materia para introducir un transgén *csa-1* en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a microinyección pronuclear (patente de EE.UU. n° 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales

## ES 2 317 690 T3

(Van der Putten y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82: 6148, 1985); manipulación dirigida de genes en células madre embrionarias (Thompson y col., *Cell* 56:313, 1989); y electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3:1803, 1983).

5 Cuando se desea integrar el transgén *csa-1* en el sitio cromosómico del gen *csa-1* endógeno, se prefiere la manipulación dirigida de genes. Brevemente, cuando se va a usar dicha técnica, se diseñan vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogos a un gen *csa-1* endógeno con el propósito de integrarlas mediante recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, y alterar la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno. El transgén también se puede introducir selectivamente en un tipo particular de célula, inactivando así el gen *csa-1*  
10 endógeno sólo en ese tipo de célula (Gu y col., *Science* 265:103, 1984). Las secuencias reguladoras necesarias para dicha inactivación específica de célula dependerán del tipo de célula particular de interés, y será algo evidente para el experto en la materia. Estas técnicas son útiles para preparar “noqueados génicos” que carecen de gen *csa* o *caa* funcionales.

15 Una vez que se han generado los animales transgénicos, se puede ensayar la expresión del transgén recombinante usando técnicas estándar. El cribado inicial se puede llevar a cabo mediante análisis de transferencia Southern o técnicas de PCR para determinar si ha tenido lugar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm del transgén en el tejido de los animales transgénicos también se puede evaluar usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a análisis por transferencia Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación en el sitio, y  
20 RT-PCR. También se pueden evaluar muestras de tejido que expresan el gen *csa* o *caa* de forma inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos del producto transgénico.

Para una revisión de las técnicas que se pueden usar para generar y evaluar animales transgénicos, los expertos en la técnica pueden consultar Gordon (*Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229, 1989), y pueden obtener más directrices, por ejemplo de: Hogan y col. “Manipulating the Mouse Embryo” (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986; Krimpenfort y col., *Bio/Technology* 9:86, 1991; Palmiter y col., *Cell* 41:343, 1985; Kraemer y col., “Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo,” Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1985; Hammer y col., *Nature* 315:680, 1985; Purcel y col., *Science*, 244:1281, 1986; Wagner y col., patente de EE.UU. nº 5.175.385; y Krimpenfort y col., patente de EE.UU. nº 5.175.384.

30 Ejemplo 5

### *Diagnóstico de condrosarcoma*

35 La invención incluye un procedimiento para detectar neoplasmas cartilagosos en una muestra de tejido obtenida de un paciente. La detección de la expresión de *csa-1* (midiendo los transcritos génicos o productos génicos) en una muestra de paciente comparada con una muestra de control o del polipéptido CSA-1, predeciría la condrogénesis indicativa, p. ej., de condrosarcoma. El procedimiento de diagnóstico de la invención se lleva a cabo midiendo la expresión del gen *csa* en un tejido, p. ej. una biopsia, o en un fluido corporal, p. ej., sangre o plasma. La detección de la expresión y determinación del nivel de expresión del gen se mide usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo hibridación en el sitio, análisis de transferencia Northern, o análisis de transferencia Western usando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de CSA-1. Un aumento del nivel de expresión de *csa-1* por célula en la muestra de ensayo de tejido comparado con el nivel por célula en el tejido de control indica la presencia de un condrosarcoma en la muestra de ensayo. Por ejemplo, se podría ensayar la expresión de CSA-1 en el tejido obtenido en  
40 una biopsia, p. ej., el nivel de transcrito o de polipéptido CSA-1. Un nivel mayor de transcrito o polipéptido de CSA-1 (comparado con el tejido normal) indica una alta probabilidad de condrosarcoma. Por ejemplo, se usó la PCR para detectar la expresión de *csa-1* en 15 muestras de biopsia de condrosarcoma obtenidas de pacientes. Por el contrario, no se detectó expresión de *csa-1* en 3 muestras de control normales obtenidas de pacientes.

50 Los procedimientos descritos anteriormente también se pueden usar para determinar el grado de un tumor. Las técnicas de transferencia Northern y PCR cuantitativa se usan para determinar el nivel de expresión del gen *csa*. Por ejemplo, la expresión elevada de CSA-1 se correlaciona con un grado más alto del tumor.

55 Los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente son útiles para identificar pacientes que necesitan intervención terapéutica para reducir o prevenir el condrosarcoma.

Ejemplo 6

### *Procedimientos de terapia*

60 Los pacientes con condrosarcoma se pueden tratar administrando ácidos nucleicos antisentido de CSA-1 o ribozimas. Otras afecciones malignas, que se caracterizan por un aumento de la expresión de CSA-1, se pueden tratar de una forma similar.

65 La terapia antisentido se usa para inhibir la expresión de proteínas, p. ej., CSA-1, implicadas en la condrogénesis, p. ej., la asociada con condrosarcoma. Por ejemplo, se introduce directamente una cadena antisentido de *csa-1* (ARN o ADN) en las células en una forma que sea capaz de unirse a los transcritos de ARNm. Alternativamente, se puede administrar un vector que contiene una secuencia que una vez dentro de las células objetivo es transcrita en el ARNm

antisentido adecuado. Los ácidos nucleicos antisentido que hibridan con el ARNm pueden disminuir o inhibir la producción del producto polipeptídico codificado por un gen por asociación con el transcrito de ARNm normalmente monocatenario, interfiriendo de esta forma en la traducción y por lo tanto, en la expresión de la proteína,

5 La terapia con ribozimas también se puede usar para inhibir la expresión de genes. Los ribozimas se unen a ARNm específico y después lo cortan en un punto de escisión predeterminado, destruyendo así el transcrito. Estas moléculas de ARN se pueden usar para inhibir la expresión de un gen *csa* implicado en la condrogénesis asociada con condrosarcoma de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (Sullivan y col., 1994, *J. Invest. Derm.* 103:85S-89S; Czubayko y col., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:21358-21363; Mahieu y col., 1994, *Blood* 84:3758-65; Kobayashi y col.  
10 1994, *Cancer Res.* 54:1271-1275).

Otro procedimiento terapéutico para inhibir la expresión de proteínas o polipéptidos es la producción de anticuerpos expresados intracelularmente que, cuando se expresan en una célula, se unen y evitan el transporte y expresión en superficie de proteínas objetivo. Los anticuerpos intracelulares pueden expresarse en una célula usando técnicas conocidas (Chen y col., 1994, *Hum. Gene Ther.* 5:595-601).

La terapia génica se puede llevar a cabo administrando a un paciente un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico, p. ej., un gen supresor de tumor tal como *caa-1*, mediante vectores y/o sistemas de suministro estándar de genes. Los sistemas de suministro de genes adecuados incluyen liposomas, sistemas de suministro mediados por receptor, ADN desnudo, y vectores víricos tales como herpesvirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados, entre otros.

Como se ha discutido anteriormente, la inflamación indeseada o patológica, tal como la asociada con la artritis reumatoide y otras artropatías inflamatorias, se puede tratar inhibiendo la expresión de CAA-1. La terapia antisentido y terapia con ribozimas se puede usar para inhibir la expresión de CAA-1, y la inmunización intracelular usando ADN que codifica un anticuerpo anti-CAA-1 se puede usar para inhibir la función del producto génico.

Una composición terapéutica puede incluir uno o más compuestos, p. ej., ácidos nucleicos o agentes inmunosupresores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica también puede incluir un sistema de suministro de genes como se ha descrito anteriormente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para administrar a un animal: p. ej., solución salina fisiológica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto es una cantidad que es capaz de producir un resultado médico deseado en un animal tratado, p. ej., la inhibición de la expresión de un gen objetivo, p. ej., una proteína secretada o de superficie celular, o inhibir la actividad celular, p. ej., proliferación, migración, presentación de antígeno, producción de anticuerpos o producción de citoquinas.

Se puede usar la administración parenteral, tal como las vías de suministro intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal, para suministrar el compuesto, siendo la vía preferida la administración intravenosa. Las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial corporal, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Las dosificaciones del compuesto que se van a administrar variarán (se espera que las dosis de agentes inmunosupresores estén en el intervalo de dosis usadas para la administración de otros agentes inmunosupresores conocidos en la materia). Una dosificación preferida para la administración intravenosa de ácidos nucleicos es de aproximadamente  $10^6$  a  $10^{22}$  copias de la molécula de ácido nucleico.  
45 Alternativamente, el compuesto se puede administrar por un implante de liberación prolongada puesto cerca del tejido enfermo o un sitio quirúrgico después de eliminar el tejido neoplásico.

Los polipéptidos CSA o polipéptidos CAA, p. ej., un polipéptido CAA-1 se puede administrar al paciente por vía intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica. Se pueden usar procedimientos estándar de suministro intracelular de péptidos, p. ej. empaquetados en liposomas. Dichos procedimientos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Se espera que la administración sea una dosificación intravenosa de aproximadamente 1 a 100  $\mu$ moles del polipéptido de la invención por kg de peso corporal y por día. Las composiciones de la invención son útiles para la administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Alternativamente, un polipéptido CAA, p. ej., CAA-1 se puede administrar como un implante para la liberación lenta en el sitio de una lesión inflamatoria.

El ADN (ADN que codifica *csa-1*, promotores específicos de célula tumoral y vectores) de la invención se puede introducir en las células objetivo del paciente mediante vectores estándar y/o sistemas de suministro de genes. Los sistemas de suministro de genes adecuados pueden incluir liposomas, sistemas de suministro mediados por receptor, ADN desnudo y vectores víricos tales como herpesvirus, retrovirus y adenovirus, entre otros. Por ejemplo, el ADN de la invención bajo el control de un promotor constitutivo fuerte se puede administrar localmente usando un sistema de suministro de adenovirus.

El ADN de la invención se puede administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica también puede incluir un sistema de suministro de genes como se ha descrito anteriormente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a un animal, p. ej. solución salina fisiológica. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del ácido nucleico de la invención que es capaz de producir un resultado médico deseado en un animal tratado.

Como es conocido en medicina, la dosificación para cualquier paciente dado depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial del cuerpo, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos administrados simultáneamente. Las dosificaciones para los compuestos de la invención variarán, pero una dosificación preferida para la administración intravenosa es de aproximadamente  $10^6$  a  $10^{22}$  copias de la molécula de ácido nucleico. La determinación de la dosificación óptima depende de la experiencia del experto en la materia. Los fármacos que inhiben el promotor de CSA-1 también se pueden administrar como se ha descrito antes para disminuir el nivel de expresión de CSA-1 en tejidos.

#### Ejemplo 7

##### *Identificación de compuestos que disminuyen la expresión de genes csa o caa*

Un procedimiento de cribado de compuestos candidatos para identificar compuestos capaces de inhibir la expresión del gen *csa*, p.ej. *csa-1*, incluye las siguientes etapas: proporcionar una célula de condrosarcoma; poner en contacto la célula con un compuesto candidato; y determinar la cantidad de expresión de *csa-1* en la célula, p. ej., por inmunotinción para detectar un polipéptido CSA-1 o hibridación *in situ*, PCR o transferencia Northern para detectar transcritos *csa-1*. Una disminución de la cantidad de expresión de *csa-1* en las células expuestas al compuesto candidato comparada con la cantidad de expresión en las células en ausencia del compuesto indica que el compuesto inhibe la expresión de *csa-1* en células de condrosarcoma.

Los compuestos que inhiben la expresión de *csa-1* también se pueden identificar poniendo en contacto el promotor de *csa-1* unido al gen indicador con un compuesto candidato, y midiendo el nivel de expresión del gen indicador en presencia y ausencia del compuesto. Un nivel reducido de expresión en presencia del compuesto comparado con este en su presencia indica que el compuesto inhibe la expresión de *csa-1*.

También se pueden usar los procedimientos de cribado descritos anteriormente para identificar compuestos que inhiben la expresión de un gen *caa* tal como *caa-1*.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos del ID SEC N°: 1, y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparado con células normales es indicativa de condrosarcoma.

2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia del ID SEC N°: 2, y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con células normales es indicativa de condrosarcoma.

3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido asociado a condrosarcoma (CSA), en la que dicha molécula de ácido nucleico consiste en: la secuencia de nucleótidos de ID SEC N°: 1 o una variante degenerada de la misma, en la que dicha variante degenerada codifica un polipéptido que consiste en al menos 50 aminoácidos de la secuencia del ID SEC N°: 2 y en la que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con las células normales es indicativa de condrosarcoma.

4. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una cadena que se hibrida en condiciones de restricción alta con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, o la complementaria a la misma.

5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende además secuencias reguladoras para la expresión de dicho polipéptido, comprendiendo dichas secuencias reguladoras un promotor.

6. Un polipéptido CSA sustancialmente puro, en el que dicho polipéptido comprende al menos 50 aminoácidos de la secuencia del ID SEC N°: 2, y en el que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con células normales es indicativa de condrosarcoma.

7. Un polipéptido CSA sustancialmente puro, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 2, y en el que la expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con células normales es indicativa de condrosarcoma.

8. Una célula aislada que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.

9. Un procedimiento para preparar un polipéptido CSA, que comprende (a) proporcionar la célula de la reivindicación 8, y (b) cultivarla en condiciones que permitan la expresión de dicha molécula de ácido nucleico, preparando así dicho polipéptido CSA.

10. Un procedimiento para diagnosticar la presencia de una célula de condrosarcoma en una muestra de tejido, que comprende medir la expresión de un gen *csa* que codifica el polipéptido CSA de la reivindicación 6 ó 7, en dicha muestra de tejido y una muestra de control, en el que un aumento de la expresión de dicho gen *csa* en dicha muestra de tejido comparada con dicha muestra de control indica que dicha muestra de tejido contiene una célula de condrosarcoma.

11. Un procedimiento para clasificar un tumor de condrosarcoma en una muestra de ensayo de tejido obtenido de paciente, que comprende determinar el nivel de expresión de un gen *csa-1* en dicha muestra de ensayo, en el que dicho gen *csa-1* codifica el polipéptido CSA de la reivindicación 6 ó 7, y compararlo con el nivel de expresión del gen *csa-1* en una muestra de control, en el que el nivel de expresión en dicha muestra de ensayo comparado con dicha muestra de control es directamente proporcional al grado de dicho tumor.

12. Un procedimiento para detectar condrosarcoma en una muestra de tejido de paciente que comprende células de cartílago, que comprende:

(a) administrar a dicha muestra de tejido de paciente una cantidad eficaz para el diagnóstico de una especie que se une específicamente a CSA-1 marcada de forma detectable, seleccionada de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, en el que dicho CSA-1 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 50% a la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y en el que dicha expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con células normales es indicativa de condrosarcoma, y

(b) determinar si dicha especie se une específicamente a células de cartílago de la muestra de tejido de paciente, siendo dicha unión una indicación de la presencia de condrosarcoma en la muestra de tejido de paciente.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el nivel de dicha unión se correlaciona con el grado de dicho condrosarcoma.

## ES 2 317 690 T3

14. Un procedimiento de detección de condrosarcoma progresivo en un paciente, que comprende

- 5 (a) administrar sucesivamente a una muestra de tejido que comprende células de cartílago procedentes de un paciente que se sospecha que tiene dicho condrosarcoma una cantidad eficaz para el diagnóstico de una especie que se une específicamente a CSA-1 marcada de forma detectable, seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, en el que dicho CSA-1 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 50% a la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2, y en el que dicha expresión diferencial de dicho polipéptido CSA comparada con células normales es indicativa de condrosarcoma, y
- 10 (b) comparar la cantidad de dicha especie que se une a células de cartílago de la muestra de tejido en sucesivas administraciones para detectar un aumento de la unión de dicha especie de unión a lo largo del tiempo, en el que dicho aumento es indicativo de condrosarcoma progresivo en dicho paciente.

15 15. Un procedimiento de cribado de un compuesto candidato para identificar un compuesto capaz de inhibir la expresión de un polipéptido CSA, que comprende:

- 20 (a) proporcionar una célula de condrosarcoma que expresa el polipéptido CSA de la reivindicación 6 ó 7;
- (b) poner en contacto dicha célula con dicho compuesto candidato; y
- 25 (c) determinar la cantidad de expresión de dicho polipéptido CSA por dicha célula, en el que una disminución de dicha cantidad en presencia de dicho compuesto candidato comparada con la cantidad en ausencia de dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato inhibe la expresión de dicho polipéptido CSA.

16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el CSA-1 es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 2.

# ES 2 317 690 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Terek, Richard M.  
 5 <120> GENES ASOCIADOS A CONDROSARCOMA  
 <130> 04930/021001  
 <140> US 09/042.225  
 10 <141 > 13-03-1998  
 <160> 8  
 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0  
 15 <210> 1  
 <211> 164  
 <212> ADN  
 20 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> CDS  
 25 <222> (1)...(156)  
 <400> 1  
 30 **atg gct gcg ggt ccc agg cca gga gct ccc tgc agg gcg ggg gct ccc 48**  
**Met Ala Ala Gly Pro Arg Pro Gly Ala Pro Cys Arg Ala Gly Ala Pro**  
**1 5 10 15**  
 35 **acg atc gta ttg acc tct gga aga aga cag aca ctt tcc cac ggg agc 96**  
**Thr Ile Val Leu Thr Ser Gly Arg Arg Gln Thr Leu Ser His Gly Ser**  
**20 25 30**  
 40 **tcc tct cca gcc aga gct aca ctt ggc aaa cct ttg gtc cta aat gat 144**  
**Ser Ser Pro Ala Arg Ala Thr Leu Gly Lys Pro Leu Val Leu Asn Asp**  
**35 40 45**  
 45 **tat tca ctg aat tgaagaaa 164**  
**Tyr Ser Leu Asn**  
**50**  
 <210> 2  
 45 <211> 52  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 2  
 55 **Met Ala Ala Gly Pro Arg Pro Gly Ala Pro Cys Arg Ala Gly Ala Pro**  
**1 5 10 15**  
**Thr Ile Val Leu Thr Ser Gly Arg Arg Gln Thr Leu Ser His Gly Ser**  
**20 25 30**  
**Ser Ser Pro Ala Arg Ala Thr Leu Gly Lys Pro Leu Val Leu Asn Asp**  
**35 40 45**  
 60 **Tyr Ser Leu Asn**  
**50**  
 <210> 3  
 <211> 884  
 <212> ADN  
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 317 690 T3

<400> 3

	acttccttgg	gttcacagca	ggggtggaac	tggattcttc	ctggatgggg	atccagatgg	60
5	aggtggagct	gcaccccttg	tagagaatgg	ctgcgggtcc	caggccagga	gctccctgca	120
	gggcgggggc	tcccacgatc	gtattgacct	ctggaagaag	acagacactt	tcccacggga	180
	gctcctctcc	agccagagct	acacttggca	aacctttggt	cctaaatgat	tattcactga	240
	attgaagaaa	tacggtttac	atatcttcca	agtatatatg	tagggttgat	ttgggaagca	300
	gaacacagca	gccc aaattt	gcttgtaatg	tctgcgacta	cagcctgctg	gcctgccttc	360
	actgtcttgg	gggaagctcg	gggagaccag	gtggactgga	gtagactgtg	cagagacact	420
10	ggtctggtga	agatgtccag	gaaaccacga	gcctccagcc	cattttccaa	caaccaccca	480
	tcaacaccaa	agaggttccc	aagacaaccc	agaagggaaa	agggaccctg	caaggaagtt	540
	ccaggaaaca	aaggctctcc	ctaaaagacc	accgcttcaa	aaaaacctga	ggaatggagt	600
	gggccaacac	tatccagcca	ctctgaccag	ccgaacgagg	aactcaatca	aaatgcgcca	660
	tagcaggacc	acaagggcaa	ggagaccacc	gccttctcca	gtgcttcctt	gggcagccag	720
	taattcccag	gcaaggccag	agacttcaag	tctatctgaa	aagtctccag	aagtctaacc	780
15	ccagataaat	agccaacagg	gtgtagagta	cgttttcac	ccaaagggta	atgccccatg	840
	gtgatggaaa	taaaatgaac	atgtttgtaa	atgaaaaaaaa	aaaa		884

20 <210> 4

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia artificial

<221> misc\_feature

<222> (1)...(14)

30

<223> n = A, T, C o G

<400> 4

35

ttttttttt ttvn

14

<210> 5

<211> 1946

40

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

45

<221> misc\_feature

<222> (1)...(1946)

<223> n = A, T, C o G

50

55

60

65

ES 2 317 690 T3

<400> 5

5	cacgcaaagc	agtgtggggt	gattctgagg	tgcactgtgg	gaaagagcct	gtcgtgtcgg	60
	tgttgctggt	ggagactcga	ttggtgggta	cagcgaaaqa	acgataacaa	aatgccggag	120
	cgagatagtg	agccgttctc	caaccctttg	gcccccgatg	gccacgatgt	ggatgatcct	180
	cactccttcc	accaatcaaa	actcaccaat	gaagacttca	ggaaantnnt	catgaccccc	240
	aggngtgac	ntacntntgc	accacntnt	aantnnntc	accatgagat	gccaaagggag	300
	tacaatgagg	atgaagaccc	agctgcacga	aggaggaaaa	agaaaagtta	ttatgccaaq	360
	ctacgccaac	aagaaattga	gagagagaga	gagctagcag	agaaagtaccg	ggatcgtgcc	420
10	aaggaacgga	gagatggagt	gaacaaagat	tatgaagaaa	ccgagcttat	cagcaccaca	480
	gctaactata	gggctgttgg	ccccactgct	gaggcggaca	aatcagctrc	agnnragaga	540
	agacanwnda	hcnaggagtc	caaattcctg	ggtggtgaca	tggaacacac	ccatttgggtg	600
	aaaggcttgg	atthtgnnt	gcttchnaan	gtncgagctg	agattgncms	cmnanaraaa	660
	nargaarang	nnctgatggn	aaanccccmg	aaagaaacca	agaaagatga	ggatcctgaa	720
	aataaaattg	aatttaaaac	acgtctgggc	gcfaatgttt	accgaatgct	ttttaagagc	780
15	aaagcatatg	agcggaatga	gttgttccctg	ccggcccgca	tggcctatgt	ggtagcacctg	840
	gatgatgagt	atgctgacac	agatatcccc	accactctta	tcccgcagca	aggctgattg	900
	ccccaccatg	gaggcccaga	ccacactgac	cacaaatgac	attgtcatta	gcaagctgac	960
	ccagatcctt	tcatacctga	ggcagggaac	ccgtaacaag	aagcttaaga	agaaggataa	1020
	agggaaagcg	gaagagaaga	aacctcctga	ggctgacatg	aatatttttg	aagacattgg	1080
20	ggattacgta	ccctccacaa	ccaagacacc	tcgggacaaq	gagcgggaga	gatatcggga	1140

25	acgggagcgt	gatcgggaaa	gagacagaga	ccgtgaccga	gagcgagagc	gagaacgaga	1200
	tcgggaaacga	gagcgaagc	gggaccgaga	gagagaagag	gaaaagaaga	gacacagcta	1260
	ctttgagaag	ccaaaagttag	atgatgagcc	catggacgct	gacaaaggac	ctgggtctac	1320
	caaggagtgtg	atcaagtcca	tcaatgaaaa	gtttgcctggg	tctgctggct	gggaaggcac	1380
	agaatcgctg	aagaagccag	aagacaaaaa	gcagctggga	gatttctttg	gcatgtccaa	1440
	cagttatgca	gagtgtacc	cagccacgat	ggatgacatg	gctgtggata	gtgatgagga	1500
	ggtggattat	agcaaaatgg	accagggtaa	caagaagggg	cccttaggcc	gctgggactt	1560
	tgatacccag	gaagaataca	gcgagtatat	gaacaacaaa	gaagctttgc	ccaaggctgc	1620
30	attccagtat	ggtatcaaaa	tgtctgaagg	gcggaaaacc	aggcgtttca	aggaaaccaa	1680
	tgacaagca	gagcttgatc	gccagtggaa	gaagattagt	gcaatcattg	angaagagga	1740
	agaagatgga	agctgatggg	gttgaagtca	aaagacaaa	atactaatca	ctagttacaa	1800
	ccagagatgc	tccacaagga	tatgctcccc	actgttttct	ttctacaatt	tccaaagggtt	1860
	gcaagatggt	ttttgtgat	gaatataaaa	ttttattgtg	taattacttg	gttccattaa	1920
35	aattggttaa	cttgctaaaa	aaaaaa				1946

<210> 6

<211> 915

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

45 <222> (1)...(912)

<221> misc\_feature

<222> (1)...(915)

50 <223> n = A, T, C o G

55

60

65

ES 2 317 690 T3

<400> 6

	atg atg agt atg ctg aca cag ata tcc cca cca ctc tta tcc cgc agc	48
	Met Met Ser Met Leu Thr Gln Ile Ser Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ser	
	1 5 10 15	
5	aag gct gat tgc ccc acc atg gag gcc cag acc aca ctg acc aca aat	96
	Lys Ala Asp Cys Pro Thr Met Glu Ala Gln Thr Thr Leu Thr Thr Asn	
	20 25 30	
10	gac att gtc att agc aag ctg acc cag atc ctt tca tac ctg agg cag	144
	Asp Ile Val Ile Ser Lys Leu Thr Gln Ile Leu Ser Tyr Leu Arg Gln	
	35 40 45	
15	gga acc cgt aac aag aag ctt aag aag aag gat aaa ggg aag ccg gaa	192
	Gly Thr Arg Asn Lys Lys Leu Lys Lys Lys Asp Lys Gly Lys Pro Glu	
	50 55 60	
20	gat tac gta ccc tcc aca acc aag aca cct cgg gac aag gag cgg gag	288
	Asp Tyr Val Pro Ser Thr Thr Lys Thr Pro Arg Asp Lys Glu Arg Glu	
	85 90 95	
25	aga tat cgg gaa cgg gag cgt gat cgg gaa aga gac aga gac cgt gac	336
	Arg Tyr Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Asp Arg Asp Arg Asp	
	100 105 110	
30	cga gag cga gag cga gaa cga gat cgg gaa cga gag cga gag cgg gac	384
	Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Asp	
	115 120 125	
35	cga gag aga gaa gag gaa aag aag aga cac agc tac ttt gag aag cca	432
	Arg Glu Arg Glu Glu Glu Lys Lys Arg His Ser Tyr Phe Glu Lys Pro	
	130 135 140	
40	aaa gta gat gat gag ccc atg gac gtt gac aaa gga cct ggg tct acc	480
	Lys Val Asp Asp Glu Pro Met Asp Val Asp Lys Gly Pro Gly Ser Thr	
	145 150 155 160	
45	aag gag ttg atc aag tcc atc aat gaa aag ttt gct ggg tct gct ggc	528
	Lys Glu Leu Ile Lys Ser Ile Asn Glu Lys Phe Ala Gly Ser Ala Gly	
	165 170 175	
50	tgg gaa ggc aca gaa tcg ctg aag aag cca gaa gac aaa aag cag ctg	576
	Trp Glu Gly Thr Glu Ser Leu Lys Lys Pro Glu Asp Lys Lys Gln Leu	
	180 185 190	
55	gga gat ttc ttt ggc atg tcc aac agt tat gca gag tgc tac cca gcc	624
	Gly Asp Phe Phe Gly Met Ser Asn Ser Tyr Ala Glu Cys Tyr Pro Ala	
	195 200 205	
60	acg atg gat gac atg gct gtg gat agt gat gag gag gtg gat tat agc	672
	Thr Met Asp Asp Met Ala Val Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Tyr Ser	
	210 215 220	
65	aaa atg gac cag ggt aac aag aag ggg ccc tta ggc cgt tgg gac ttt	720
	Lys Met Asp Gln Gly Asn Lys Lys Gly Pro Leu Gly Arg Trp Asp Phe	
	225 230 235 240	
70	gat acc cag gaa gaa tac agc gag tat atg aac aac aaa gaa gct ttg	768
	Asp Thr Gln Glu Glu Tyr Ser Glu Tyr Met Asn Asn Lys Glu Ala Leu	
	245 250 255	
75	ccc aag gct gca ttc cag tat ggt atc aaa atg tct gaa ggg cgg aaa	816
	Pro Lys Ala Ala Phe Gln Tyr Gly Ile Lys Met Ser Glu Gly Arg Lys	
	260 265 270	
80	acc agg cgc ttc aag gaa acc aat gac aaa gca gag ctt gat cgc cag	864
	Thr Arg Arg Phe Lys Glu Thr Asn Asp Lys Ala Glu Leu Asp Arg Gln	
	275 280 285	
85	tgg aag aag att agt gca atc att gan gaa gag gaa gaa gat gga agc	912
	Trp Lys Lys Ile Ser Ala Ile Ile Xaa Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ser	
	290 295 300	
90	tga	915

ES 2 317 690 T3

<210> 7

<211> 304

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Variante

10 <222> (1)...(304)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 7

```

15      Met Met Ser Met Leu Thr Gln Ile Ser Pro Pro Leu Leu Ser Arg Ser
        1      5      10
      Lys Ala Asp Cys Pro Thr Met Glu Ala Gln Thr Thr Leu Thr Thr Asn
        20      25      30

20      Asp Ile Val Ile Ser Lys Leu Thr Gln Ile Leu Ser Tyr Leu Arg Gln
        35      40      45
      Gly Thr Arg Asn Lys Lys Leu Lys Lys Lys Asp Lys Gly Lys Pro Glu
        50      55      60
25      Glu Lys Lys Pro Pro Glu Ala Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Ile Gly
        65      70      75      80
      Asp Tyr Val Pro Ser Thr Thr Lys Thr Pro Arg Asp Lys Glu Arg Glu
        85      90      95
      Arg Tyr Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Asp Arg Asp Arg Asp
        100      105      110
30      Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Asp Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Asp
        115      120      125
      Arg Glu Arg Glu Glu Glu Lys Lys Arg His Ser Tyr Phe Glu Lys Pro
        130      135      140
35      Lys Val Asp Asp Glu Pro Met Asp Val Asp Lys Gly Pro Gly Ser Thr
        145      150      155      160
      Lys Glu Leu Ile Lys Ser Ile Asn Glu Lys Phe Ala Gly Ser Ala Gly
        165      170      175
      Trp Glu Gly Thr Glu Ser Leu Lys Lys Pro Glu Asp Lys Lys Gln Leu
        180      185      190
40      Gly Asp Phe Phe Gly Met Ser Asn Ser Tyr Ala Glu Cys Tyr Pro Ala
        195      200      205
      Thr Met Asp Asp Met Ala Val Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Tyr Ser
        210      215      220
45      Lys Met Asp Gln Gly Asn Lys Lys Gly Pro Leu Gly Arg Trp Asp Phe
        225      230      235      240
      Asp Thr Gln Glu Glu Tyr Ser Glu Tyr Met Asn Asn Lys Glu Ala Leu
        245      250      255
      Pro Lys Ala Ala Phe Gln Tyr Gly Ile Lys Met Ser Glu Gly Arg Lys
        260      265      270
50      Thr Arg Arg Phe Lys Glu Thr Asn Asp Lys Ala Glu Leu Asp Arg Gln
        275      280      285
      Trp Lys Lys Ile Ser Ala Ile Ile Xaa Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ser
        290      295      300

```

55

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

65      Arg Arg Gln Thr Leu Ser His Gly Ser Ser Ser Pro Ala Arg Ala Cys
        1      5      10      15

```