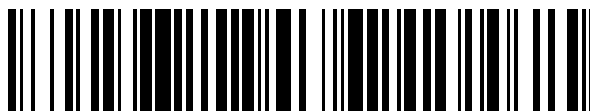


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 753**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08733105 .4**
96 Fecha de presentación: **03.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2132562**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **Métodos de evaluación de células y cultivos celulares**

30 Prioridad:
06.04.2007 US 910574 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es:
**GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:
**RAPKO, Stephen, M. y
DUGUAY, Stephen, J.**

74 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

ES 2 380 753 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

Métodos de evaluación de células y cultivos celulares

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud provisional 60/910,574 presentada el 6 de abril de 2007.

5 [0002] Esta invención guarda relación con los métodos de determinación de la composición de un cultivo celular, y más concretamente, con métodos para diferenciar los condrocitos de los fibroblastos.

10 [0003] Las lesiones del cartílago articular presentan bajas tasas de reparación, debido en parte a la falta de aporte sanguíneo en el tejido cartilaginoso (Basad y cols., En: Hendrich y cols., Cartilage Surgery and Future Perspectives, Thieme Verlag, 49-56 (2003)). El traumatismo de la articulación de la rodilla puede producir, por ejemplo, lesiones condrales y osteocondrales, y, dichas lesiones pueden evolucionar a osteoartritis (Brittberg y cols., New England Journal of Medicine, 331(14): 889-895 (1994)). En casos graves de osteoartritis, puede ser necesaria la artroplastia total de rodilla. Sin embargo, las prótesis artificiales usadas en las artroplastias de rodilla tienen ciclos de vida útil limitados, por lo que las artroplastias de rodilla no constituyen soluciones idóneas, especialmente en pacientes de edad no avanzada (Brittberg y cols., *supra*).

15 [0004] En algunos casos, las lesiones del cartílago articular pueden repararse mediante el implante de condrocitos autólogos (Brittberg y cols., Clin. Orthopaed. Rel. Res., 367S: S147-S155 (1999)). En esta intervención, se recogen condrocitos de un paciente, se expanden en un cultivo celular para aumentar el número de condrocitos y, posteriormente, se vuelven a implantar en el paciente, la zona de la lesión. Los condrocitos se cubren con un colgajo de tejido perióstico para precintar los condrocitos en el lugar de la lesión. Aunque los condrocitos cultivados muestran tendencia a desdiferenciarse en cultivo, en el implante realizado con éxito, los condrocitos desdiferenciados conservan su capacidad de rediferenciación y se rediferenciarán a condrocitos que producen tejido cartilaginoso hialino tras la implantación.

20

[0005] En una técnica modificada conocida como implante de condrocitos autólogos inducidos en matriz (procedimiento de implantación MACI®), los condrocitos cultivados se cargan en una matriz de colágeno antes de implantarse en el paciente (Basad y cols., *supra*). Además, la matriz de colágeno puede fijarse con adhesivo de fibrina en lugar de suturarse, lo que simplifica la técnica quirúrgica.

25

[0006] Pueden usarse distintas técnicas y medios para cultivar condrocitos. Por ejemplo, se describen ejemplos de medios de cultivo de condrocitos sin suero y métodos de aislamiento y propagación de condrocitos, en las patentes EE. UU. números 6,150,163 y 7,169,610, y en la solicitud provisional de patente EE. UU. N.º 60/805,307.

30 [0007] Con los condrocitos pueden aislarse conjuntamente fibroblastos o células fibroblastoides (como los sinoviocitos) y, de este modo, copropagarse en un cultivo celular durante la preparación de implantes de condrocitos. Se sabe que los condrocitos toman el aspecto de fibroblastos cuando se desdiferencian en cultivo (Benya y Shaffer, Cell, 30: 215-224 (1982)). Sin embargo, mantienen su capacidad de diferenciación, es decir, son capaces de volver a expresar un fenotipo condrocitario tras la implantación. En consecuencia, puede ser difícil distinguir por su aspecto los condrocitos desdiferenciados cultivados de los fibroblastos o células fibroblastoides cocultivados.

35

[0008] Además, los patrones de expresión génica de los condrocitos desdiferenciados cultivados son distintos de los de los condrocitos nativos del cartílago. Por ejemplo, muchos marcadores netamente expresados en los condrocitos nativos del cartílago presentan un nivel reducido de expresión en los condrocitos cultivados (Binette y cols., J. Orthopaed. Res., 16: 207-216 (1998)). En consecuencia, la expresión de tal marcador condrocitario puede no distinguir necesariamente un condrocito desdiferenciado de células de otro tipo que puedan estar presentes en el cultivo celular. Además, muchos marcadores conocidos de los fibroblastos se expresan tanto en los condrocitos desdiferenciados como en los condrocitos nativos del cartílago, aunque en diferentes niveles. En consecuencia, el nivel de expresión de tal marcador fibroblástico puede no indicar necesariamente si las células presentes en la muestra sean un condrocitos desdiferenciados, fibroblastos, o células fibroblastoides.

40

45 A partir de WO 2006/094836 se conoce un método que distingue entre los condrocitos y los fibroblastos, que se basa en el nivel de expresión y/o de metilación del ADN de siete genes.

Stokes y cols., Arthritis and Rheumatism, vol. 46, no. 2, 2002, pp 404-419 muestra que tanto los condrocitos diferenciados como los desdiferenciados expresan marcadores característicos del cartílago, pero no se comparan con los fibroblastos.

50 En documentos Martlovits y cols., FASEB Journal, vol. 15, no. 4, 2001, página A34 y Kolettas y cols., J. of Cell Science, vol. 108, no. Parte 5, 1995, pp. 1991-1999 se destaca la similitud en el patrón de expresión de los condrocitos desdiferenciados y los fibroblastos.

[0009] Es necesario disponer de métodos para identificar los condrocitos, los fibroblastos y las células fibroblastoides, especialmente, de métodos aplicables al cultivo celular.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 [0010] En ciertos aspectos, los métodos de la invención proporcionan métodos para evaluar la composición de un cultivo celular (por ejemplo, para distinguir los condrocitos de los fibroblastos). Los métodos de la invención pueden usarse, por ejemplo, para evaluar los cultivos de condrocitos usados para el tratamiento de defectos del cartílago. Esta invención incluye un método de evaluación de la composición de un cultivo celular, comprendiendo el método:

- a) obtener un conjunto de células diversas de un cultivo celular;
- 10 b) determinar el nivel de expresión promedio de un marcador fibroblástico en un conjunto diverso de células entre las que el marcador fibroblástico es el MFAP5; y
- c) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión promedio de la proteína microfibrilar 5 asociada (MFAP5); donde el nivel de expresión medio de MFAP5 por debajo de un determinado umbral indica que el cultivo celular incluye condrocitos.

15 También incluye un método de evaluación de la composición de un cultivo celular, comprendiendo el método lo siguiente:

- a) aislamiento de células de biopsia de cartílago procedente de mamífero;
- b) cultivo de células aisladas en el paso a) en un cultivo celular;
- c) obtención de una muestra de cultivo celular;
- 20 d) determinación del nivel de expresión de MFAP5 y HAPLN 1 en una o más células de la muestra; y –
- e) determinación de la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión de MFAP5 y HAPLN1.

25 [0011] La invención se basa, al menos en parte, en la identificación del MFAP5 como un marcador del fenotipo celular que se expresa en alto grado en ciertos tipos celulares no condrocitarios, como fibroblastos o sinoviocitos, al tiempo que se expresa en un nivel significativamente inferior en los condrocitos. La invención también se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que las proporciones del nivel de expresión de MFAP5 y un marcador condrocitario, como el HAPLN1, constituye un indicador fiable del fenotipo celular en cultivos derivados de biopsias de cartílago. Mientras que bajo ciertas condiciones puede ser preferible usar ambos tipos de marcadores (por ejemplo, marcadores de fibroblastos y condrocitos) para confirmar la composición del cultivo celular o el fenotipo de una célula individual, la invención también proporciona materializaciones en las que la determinación del nivel de expresión normalizada del marcador MFAP5 aislado puede ser suficiente para tal fin.

35 [0012] El nivel de expresión normalizado de MFAP5 es inferior en los condrocitos que en los fibroblastos. En algunas materializaciones, el marcador de los fibroblastos es el MFAP5, y su nivel de expresión normalizado es inferior en los condrocitos (por ejemplo, condrocitos primarios y/o transferidos) que en los fibroblastos y/o los sinoviocitos. En algunas materializaciones, el marcador de los fibroblastos se expresa al menos 2, 5, 8, 10 veces menos en los condrocitos que en los fibroblastos y/o los sinoviocitos.

40 [0013] Así pues, en un aspecto, la invención proporciona un método de evaluación de la composición de un cultivo celular (Método 1), es decir, cultivo celular que, con cierta probabilidad, contiene condrocitos; también se describe un método de referencia para evaluar el fenotipo de una célula individual (Método 2). En las materializaciones del Método 1, el nivel de expresión de cada marcador se determina como el nivel de expresión promedio de dicho marcador en una diversidad de células (es decir, la muestra de cultivo). En las materializaciones del Método 1, la composición de un cultivo celular puede ser evaluado en conjunto para determinar si contiene condrocitos. En algunos aspectos del Método 2, el nivel de expresión de un marcador se determina como el nivel de expresión de dicho marcador en la célula individual que se está evaluando. Así pues, mientras que el Método 1 identifica la composición del cultivo celular, el Método 2 identifica el fenotipo de una célula aislada, es decir, si dicha célula es o no un condrocito.

45 [0014] En algunas materializaciones, el Método 1 comprende:

- a) obtener un conjunto de células diversas de un cultivo celular;
- b) determinar el nivel de expresión promedio de un marcador fibroblástico de la invención en un conjunto diverso de células del cultivo celular entre las que el marcador fibroblástico es el MFAP5; y
- c) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión;

donde el nivel de expresión por debajo de un umbral predeterminado indica que el cultivo celular incluye condrocitos. De forma alternativa, el nivel de expresión por encima de un umbral predeterminado indica que el cultivo celular no contiene condrocitos (es decir, el cultivo no comprende al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más condrocitos).

5 [0015] En algunas materializaciones, el Método 1 implica comparar los niveles de expresión de un marcador fibroblástico (MFAP5) y un marcador condrocitario (es decir, HAPLN1) con un control o entre sí. En algunas materializaciones, el marcador fibroblástico y el marcador condrocitario son tales que la proporción de sus niveles de expresión (marcador condrocitario respecto al marcador fibroblástico) en condrocitos primarios y/o transferidos es superior o igual a 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 o más veces la proporción de la expresión en fibroblastos cultivados.

10 [0016] En particular, en algunas materializaciones, el Método 1 comprende:

- a) obtener un conjunto de células diversas de un cultivo celular;
- b) determinar el nivel de expresión medio de un marcador condrocitario en el conjunto de células diversas;
- c) determinar el nivel de expresión medio de un marcador fibroblástico en el conjunto de células diversas;

15 y
d) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión promedio del marcador condrocitario y el nivel de expresión medio del marcador fibroblástico.

20 En algunas materializaciones, el cultivo se identifica como que contiene condrocitos si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por encima de un umbral preestablecido, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por debajo de un umbral preestablecido. De forma alternativa, el nivel de expresión del marcador fibroblástico por encima de un umbral predeterminado indica que el cultivo celular no contiene condrocitos (es decir, el cultivo no comprende al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más condrocitos).

25 [0017] En algunas materializaciones, determinar la composición del cultivo incluye comparar el nivel de expresión promedio del marcador condrocitario y el nivel de expresión medio del marcador fibroblástico. En algunas materializaciones, los niveles de expresión de los marcadores se comparan respecto a su relación entre sí (por tanto, los umbrales pueden definirse, por ejemplo, como una diferencia dada entre los niveles de expresión de dos marcadores, o una proporción entre los mismos). Por ejemplo, en algunas materializaciones, una proporción entre el nivel de expresión de un marcador condrocitario (por ejemplo, HAPLN1) respecto al de un marcador fibroblástico (por ejemplo, MFAP5), que sea mayor de un umbral predeterminado, por ejemplo, 0,25, 0,55, 1, 2, 2,2, 5, 10, 25, 50 o más, indica que el cultivo celular contiene condrocitos.

35 [0018] En algunas materializaciones del Método 1, los niveles de expresión de los marcadores condrocitarios y fibroblásticos están determinados a nivel del ARN, por ejemplo, según un método cuantitativo de curva estándar de RT-PCR (PCR en tiempo real) o según un método C_T cuantitativo comparativo de PCR en tiempo real (que mide la diferencia en el número de ciclos umbral requeridos para el marcador fibroblástico y los marcadores condrocitarios).

40 [0019] En un aspecto relacionado, la descripción constituye un método para evaluar el fenotipo de una célula individual (Método 2), por ejemplo, usando citometría de flujo o RT-PCR con una sola célula. El método es útil para identificar células individuales en un cultivo celular, incluidos cultivos celulares derivados de cartílago o sinovial, cultivos de condrocitos, cultivos de fibroblastos, cultivos de sinoviocitos, o cualquier otro cultivo que resulte apropiado. El método también es útil para identificar células individuales derivadas de cualquier muestra biológica apropiada en la que se desee identificar células individuales, incluidas muestras de cartílago, muestras de sinovial, muestras de fibroblastos, etc. Los marcadores fibroblásticos y condrocitarios en el Método 2 deben elegirse y evaluarse como se describe para el Método 1.

45 [0020] En algunas materializaciones, el Método 2 comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de un marcador fibroblástico de la invención en la célula; y
- b) determinar el fenotipo de la célula basándose en el nivel de expresión del marcador fibroblástico;

donde el nivel de expresión por debajo de un umbral predeterminado indica que la célula es un condrocito. De forma alternativa, el nivel de expresión por encima de un umbral predeterminado indica que la célula no es un condrocito (por ejemplo, un fibroblasto o un sinoviocito). En algunos aspectos, el Método 2 comprende:

50 a) determinar el nivel de expresión de un marcador condrocitario en la célula;

b) determinar el nivel de expresión de un marcador fibroblástico en la célula; y

c) evaluar el fenotipo de la célula basándose en el nivel de expresión del marcador condrocitario y el nivel de expresión del marcador fibroblástico.

5 En algunas materializaciones, la célula se identifica como un condrocito si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por encima de un umbral preestablecido, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por debajo de un umbral preestablecido. De forma alternativa, la célula no será un condrocito si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por debajo de un umbral preestablecido, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por encima de un umbral preestablecido. En algunas materializaciones, el paso c) de la evaluación del fenotipo de la célula incluye comparar el nivel de expresión del marcador condrocitario y el nivel de expresión del marcador fibroblástico.

[0021] En la descripción que sigue a continuación se expondrán aspectos adicionales de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0022] La **figura 1** es un diagrama de flujo que ilustra los estadios en un proceso de fabricación ejemplar usado para producir condrocitos cultivados a partir de biopsias condrocitarias.

15 [0023] La **figura 2** describe el nivel de expresión de HAPLN1 en varias cepas celulares determinadas mediante un método de curva estándar de RT-PCR. Los niveles de expresión fueron normalizados según el ARN ribosómico 18S. El nivel de expresión en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia. Las cepas celulares usadas se enumeran en la tabla 2.

20 [0024] La **figura 3** describe los niveles de expresión de MFAP5 en las mismas cepas celulares como se muestra en la figura 2, según se determinó mediante un método de curva estándar de RT-PCR. Los niveles de expresión fueron normalizados según el ARN ribosómico 18S. El nivel de expresión en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

25 [0025] La **figura 4** describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 de las figuras 2 y 3. La proporción en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

[0026] La **figura 5** describe los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 2. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

30 [0027] La **figura 6** describe los niveles de expresión de HAPLN1 en un número de cepas adicionales de condrocitos y sinoviocitos. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR y normalizado según el ARN ribosómico 18S. El nivel de expresión en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia. Las cepas celulares usadas se enumeran en la tabla 3.

35 [0028] La **figura 7** describe los niveles de expresión de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 6. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR y normalizado según el ARN ribosómico 18S. El nivel de expresión en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

[0029] La **figura 8** describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 de las figuras 6 y 7. La proporción en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

40 [0030] La **figura 9** describe los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 6. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

45 [0031] La **figura 10A** describe los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en las figuras 2 y 6, así como cepas adicionales de condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos dérmicos identificados en la tabla 4. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR usando cebadores y sondas diseñadas a medida según se describe en el ejemplo 3. Las proporciones HAPLN1:MFAP5 se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$. La **figura 10B** describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en cepas celulares adicionales como se muestra en la tabla 5. Los niveles de expresión se determinaron usando los mismos métodos descritos en la figura 10A.

5 [0032] La **figura 11** muestra una comparación entre las proporciones del nivel de expresión para HAPLN1 y MFAP5 en cultivos monocapa y con estructura de colágeno. Las cepas celulares se enumeran en la tabla 7. Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR. Los niveles de expresión fueron normalizados según el ARN ribosómico 18S. La proporción en cultivo monocapa de condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

[0033] La **figura 12** muestra una comparación entre las proporciones del nivel de expresión para HAPLN1 y MFAP5 en cultivos monocapa y con estructura de colágeno usando las mismas cepas como se muestra en la figura 11. Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

10 [0034] La **figura 13** describe el cambio en las proporciones del nivel de expresión de HAPLN1 y MFAP5 como una función del nivel de cultivo. Tres cepas de sinoviocitos se cultivaron a partir de cultivo primario (nivel 1 de cultivo) hasta la cuarta transferencia (nivel 5 de cultivo), como se muestra en la figura. Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

15 [0035] Las **figuras 14A y 14B** describen el cambio en las proporciones del nivel de expresión de HAPLN1 y MFAP5 como una función del nivel de cultivo. En las figuras 14A y 14B, se obtuvieron cepas de condrocitos a partir de cartílago (nivel 0 de cultivo) que, posteriormente, se cultivaron a partir de transferencia primaria (nivel 1 de cultivo) hasta transferencia secundaria (nivel 3 de cultivo), como se muestra en la figura. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR usando cebadores y sondas diseñadas a medida según se describe en el ejemplo 5. La proporción HAPLN1:MFAP5 se calculó como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

20 [0036] La **figura 15** describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 en cultivos de poblaciones mixtas de condrocitos y sinoviocitos. Se llevaron a cabo tres ensayos, cada uno con proporciones variables de los dos tipos celulares. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR usando cebadores y sondas diseñadas a medida según se describe en el ejemplo 6. Las proporciones HAPLN1:MFAP5 se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

25 [0037] La **figura 16** describe las proporciones molares de los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en varias cepas celulares, que se muestran en la tabla 12, usando números absolutos de copias de los marcadores determinados mediante un método de cuantificación absoluto. La RT-PCR se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 3, excepto porque se usaron 2 μ l de cDNA por cada 13 μ l de reacción PCR. Las curvas estándares se prepararon a partir de estándares sintéticos de transcripciones de ARN de HAPLN1 y MFAP5 pasadas a 10^3 , 10^4 y 10^5 copias/reacción. La cantidad de copias de ARNm de HAPLN1 y MFAP5 presentes en cada muestra analizada se determinó a partir de estas curvas estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 [0038] La invención se basa, al menos en parte, en la identificación del MFAP5 como un gen que se expresa en alto grado en ciertos tipos celulares no condrocitarios, como fibroblastos o sinoviocitos, al tiempo que se expresa en un grado significativamente inferior en los condrocitos. En consecuencia, la invención proporciona métodos para usar MFAP5 como marcador del fenotipo celular. MFAP5 es una proteína rica en serina-treonina que se une a las fibrilinas y que se consideró que intervenía en la estabilización del procolágeno de tipo I (Lemaire y cols. *Arthritis & Rheumatism*, 52(6): 1812-1823 (2005)). Las secuencias del nucleótido y del aminoácido del MFAP5 humano puede encontrarse en el N.º de Aceptación GenBank® NM_003480; su secuencia nucleotídica también se proporciona como SEQ ID NO:1. Además de, o en lugar de MFAP5, también pueden usarse otros marcadores fibroblásticos en los métodos de la invención, como se describe más abajo.

40 [0039] En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un método de evaluación de la composición de un cultivo que incluya condrocitos (Método 1) Y también se describe un método de referencia para evaluar el fenotipo de una célula individual (Método 2).

45 [0040] En las materializaciones del Método 1, el nivel de expresión de cada marcador se determina como el nivel de expresión promedio de dicho marcador en una diversidad de células. En las materializaciones del Método 1, la composición de un cultivo celular puede ser evaluado en conjunto para determinar si contiene condrocitos. En los aspectos del Método 2, el nivel de expresión de un marcador se determina como el nivel de expresión de dicho marcador en una célula individual que se está evaluando. Así pues, mientras que el Método 1 identifica la composición del cultivo celular, el Método 2 identifica el fenotipo de una célula aislada, por ejemplo, si dicha célula es o no un condrocito.

50 [0041] En algunas materializaciones, el marcador de los fibroblastos se expresa al menos 2, 5, 8, 10 veces menos, o menos aún, en los condrocitos que en los fibroblastos y/o los sinoviocitos. Tales marcadores adicionales pueden identificarse mediante, por ejemplo un análisis de matriz génica, como se describe, por ejemplo, en Leung y cols., *Trends in Genetics*, 19(11): 649 -659 (2003).

55

- 5 [0042] En algunas materializaciones, el Método 1 comprende la determinación del nivel de expresión de un marcador fibroblástico de la invención en un conjunto diverso de células de un cultivo celular, donde el nivel de expresión por debajo de un umbral predeterminado indica que el cultivo celular incluye condrocitos. De forma alternativa, el nivel de expresión por encima de un umbral predeterminado indica que el cultivo celular no contiene condrocitos (es decir, el cultivo no comprende al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más condrocitos).
- 10 [0043] En la invención, el marcador de los fibroblastos es el MFAP5, y una expresión de MFAP5 superior al umbral por parte del cultivo celular indica que el cultivo contiene un número sustancial de no condrocitos. En algunas materializaciones, el nivel umbral predeterminado es 1) igual o inferior al de la expresión de MFAP5 en cultivos de fibroblastos puros (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 veces inferior) o 2) igual o mayor que (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 veces superior) el nivel de expresión de MFAP5 en cultivos de condrocitos puros (por ejemplo, condrocitos primarios obtenidos a partir de biopsias de cartílago). El nivel "predeterminado" no hay que seleccionarlo antes de determinar los niveles de expresión del marcador y puede seleccionarse después de determinar los niveles de expresión, basándose, por ejemplo, en el análisis estadístico de los resultados de expresión.
- 15 [0044] La pluralidad de células del cultivo que se está evaluando puede representarse mediante una muestra o una alícuota obtenida de dicho cultivo. Por ejemplo, en el caso de cultivos crecidos en matrices de colágeno, la muestra obtenida por punción puede usarse como se describe en los Ejemplos. La pluralidad de células contendrá típicamente al menos el número de células suficiente para llevar a cabo un método dado de análisis de expresión, o más. Por ejemplo, para la PCR son suficientes generalmente sólo de 10 a 1.000 células, aunque también puede usarse un número inferior.
- 20 [0045] En algunas materializaciones, el Método 1 y el Método 2 implican comparar los niveles de expresión de un marcador fibroblástico (MFAP5) y un marcador condrocitario (por ejemplo, HAPLN1 u otro marcador condrocitario) con un control o entre sí. El orden en que se determinen los niveles de expresión de ambos marcadores puede variar. Por ejemplo, se puede determinar primero el nivel de expresión de un marcador condrocitario y a continuación determinar el nivel de expresión de un marcador fibroblástico, o viceversa. En algunas materializaciones, los niveles de expresión de ambos tipos de marcadores puede determinarse simultáneamente.
- 25 [0046] En la tabla 1 se muestran ejemplos de algunos marcadores condrocitarios útiles en los métodos de la invención, incluidos sus números de aceptación GenBank™ y los SEQ ID NOs. Así pues, en algunas materializaciones, el marcador condrocitario se selecciona entre HAPLN1, MGP, EDIL3, WISP3, AGC1, COMP, COL2A1, COL9A1, COL11A1, LECT1, S100B, CRTAC1, SOX9 y NEBL.
- 30

Tabla 1: Ejemplos de marcadores condrocitarios

Nombre del marcador	GenBank™ N.º de aceptación	SEQ ID NO	Referencia
Proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano (HAPLN1)	NM_001884	SEQ ID NO:2	Buckwalter y cols., J. Biol. Chem., 259(9): 5361-5363 (1984)
Proteína Gla de matriz (MGP)	NM_000900	SEQ ID NO:3	Monroe y cols., Nat Genet., 21(1): 142-4 (1999)
Repeticiones tipo GF y dominios tipo discoidina I 3 (EDIL3)	NM_005711	SEQ ID NO:4	Genes Dev., 12(1): 21-33 (1998)
Proteína 3 de señal inducida por WNT1 (WISP3)	NM_003880	SEQ ID NO:5	Kutz y cols., Mol. Cell. Biol., 25(1): 414-21 (2005)
Agrecano 1 (AGC1)	NM_001135	SEQ ID NO:6	Roughley y cols., Eur. Cell Mater., 11: 1-7 (2006)
proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP)	NM_000095	SEQ ID NO:7	Song y cols., J. Hum. Genet., 48(5): 222-5 (2003)
colágeno de tipo II (COL2A1)	NM_001844	SEQ ID NO:8	Nishimura y cols., Hum. Mutat., 26(1): 36-43 (2005)
colágeno de tipo IX (COL9A1)	NM_001851	SEQ ID NO:9	Czarny-Ratajczak y cols., Am. J. Hum. Genet., 69(5): 969-80 (2001))
colágeno de tipo XI (COL11A1)	NM_001854	SEQ ID NO:10	Poulson y cols., J. Med. Genet., 41(8):e107 (2004)
quimiotaxina 1 derivada de células leucocitarias (LECT1)	NM_007015	SEQ ID NO:11	Hiraki y cols., Eur. J. Biochem., 260(3): 869-78 (1999)
proteína beta fijadora de calcio S100 (S100B)	NM_006272	SEQ ID NO:12	Steffansson y cols., Nature, 295(5844): 63-4 (1982)
proteína ácida cartilaginosa 1 (CRTAC1)	NM_018058	SEQ ID NO:13	Steck y cols., Biochem. J., 353: 169-174 (2001)
proteína 9 de la caja SRY (SOX9)	NM_000346	SEQ ID NO:14	Kou e Ikegawa, J. Biol. Chem., 279(49): 50942-8 (2004)
nebulette (NEBL)	NM_006393	SEQ ID NO:15	Grogan y cols., Arth. & Rheum., 56(2): 586-95 (2007)

5 [0047] Otros marcadores condrocitarios adicionales pueden identificarse mediante, por ejemplo, un análisis de matriz génica, como se describe, por ejemplo, en Leung y cols., Trends in Genetics, 19(11): 649-659 (2003). Generalmente, un marcador condrocitario es un gen o una proteína cuyos niveles de expresión normalizados son superiores en los condrocitos (por ejemplo, condrocitos primarios, condrocitos cultivados desdiferenciados) que en los fibroblastos (por ejemplo, fibroblastos dérmicos) y/o los sinoviocitos. En algunas materializaciones, el marcador de los condrocitos se expresa al menos 2, 4, 8, 10, 50, 75, 100 veces o más en los condrocitos que en los fibroblastos y/o los sinoviocitos.

10 [0048] En algunas materializaciones, el marcador fibroblástico y el marcador condrocitario se seleccionan de tal modo que la proporción de sus niveles de expresión en condrocitos primarios y/o condrocitos transferidos es superior o igual a 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 o más veces que en fibroblastos dérmicos y/o sinoviocitos.

[0049] En particular, en algunas materializaciones, el Método 1 comprende:

- a) obtener un conjunto de células diversas de un cultivo celular;
- b) determinar el nivel de expresión medio de un marcador condrocitario en el conjunto de células diversas;
- 5 c) determinar el nivel de expresión medio de MFAP5 en el conjunto de células diversas; y
- d) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión promedio del marcador condrocitario y el nivel de expresión medio del marcador fibroblástico.

10 En algunas materializaciones, el cultivo se identifica como que contiene condrocitos si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por encima de un umbral preestablecido, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por debajo de un umbral preestablecido. De forma alternativa, el cultivo no contiene condrocitos (por ejemplo, el cultivo no comprende al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más condrocitos) si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por debajo de un umbral predeterminado, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por encima de un umbral preestablecido.

15 [0050] En posteriores materializaciones del Método 1, la invención comprende un método de evaluación de la composición de un cultivo celular, comprendiendo dicho método:

- a) aislamiento de células de biopsia de cartílago procedente de mamífero
- b) cultivo de células aisladas en el paso a) en un cultivo celular;
- c) obtención de una muestra de cultivo celular;
- 20 d) determinación de los niveles de expresión de MFAP5 y HAPLN1 en una o más células de la muestra; y
- e) determinación de la composición del cultivo basándose en los niveles de expresión de MFAP5 y HAPLN1.

25 [0051] En algunas materializaciones, el paso de determinación de la composición del cultivo incluye comparar los niveles de expresión promedio del marcador condrocitario y el nivel de expresión medio del marcador fibroblástico. En algunas de tales materializaciones, el cultivo celular se evalúa como que contiene condrocitos cuando la proporción de la expresión de HAPLN1 respecto a MFAP5 es mayor de 0,25. En materializaciones particulares, esta proporción indica que cultivo celular contiene al menos un 50 % de condrocitos.

30 [0052] En algunas materializaciones, los niveles de expresión de los marcadores se comparan respecto a su relación entre sí (por tanto, los umbrales pueden definirse, por ejemplo, como una diferencia dada entre los niveles de expresión de dos marcadores o una proporción entre los mismos). Por ejemplo, en algunas materializaciones, una proporción entre el nivel de expresión de un marcador condrocitario (por ejemplo, HAPLN1) respecto al de un marcador fibroblástico (por ejemplo, MFAP5), que sea mayor de un umbral predeterminado, por ejemplo, 0,25, 0,55, 1, 2, 2,2, 5, 10, 25, 50 o más, indica que cultivo celular contiene condrocitos.

35 [0053] En algunas materializaciones del Método 1, los niveles de expresión de los marcadores condrocitarios y fibroblásticos están determinados a nivel del ARN, por ejemplo, según un método cuantitativo de curva estándar de RT-PCR (PCR en tiempo real) o según un método C_T cuantitativo comparativo de PCR en tiempo real (que mide la diferencia en el número de ciclos umbral requeridos para el marcador fibroblástico y los marcadores condrocitarios).

40 [0054] En un aspecto relacionado, la descripción constituye un método para evaluar el fenotipo de una célula individual (Método 2), por ejemplo, usando citometría de flujo. El método es útil para identificar células individuales en un cultivo celular, incluidos cultivos celulares derivados de cartílago o sinovial, cultivos de condrocitos, cultivos de fibroblastos, cultivos de sinoviocitos, o cualquier otro cultivo que resulte apropiado. El método también es útil para
45 identificar células individuales derivadas de cualquier muestra biológica apropiada en la que se desee identificar células individuales, incluidas muestras de cartílago, muestras de sinovial, muestras de fibroblastos, etc. En algunas materializaciones, el Método 2 comprende determinar el nivel de expresión de un marcador fibroblástico de la invención en la célula, donde el nivel de expresión por debajo de un umbral predeterminado indica que la célula es un condrocito. De forma alternativa, el nivel de expresión por encima de un umbral predeterminado indica que la célula no es un condrocito (por ejemplo, la célula es un fibroblasto o un sinoviocito). En algunos aspectos, el Método 2 comprende:

- 50 a) determinar el nivel de expresión de un marcador condrocitario en la célula;

- b) determinar el nivel de expresión de un marcador fibroblástico en la célula; y
- c) evaluar el fenotipo de la célula basándose en el nivel de expresión del marcador condrocitario y el nivel de expresión del marcador fibroblástico.

5 En algunas materializaciones, la célula se identifica como un condrocito si el nivel de expresión del marcador condrocitario se encuentra por encima de un umbral preestablecido, mientras que el nivel de expresión del marcador fibroblástico se encuentra por debajo de un umbral preestablecido. Los marcadores fibroblásticos y condrocitarios en los aspectos del Método 2 pueden elegirse y evaluarse como se describe para el anterior Método 1.

10 [0055] La citometría de flujo puede llevarse a cabo usando anticuerpos comercialmente disponibles o dichos anticuerpos pueden prepararse como se describe en, por ejemplo, Linsenmeyer y cols., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 92(2): 440-6 (1980).

15 [0056] Las células y cultivos que se evalúan mediante los métodos de esta invención pueden obtenerse de cualquier muestra biológica, incluido cualquier tejido, cultivo celular, u otro material, que puede o no contener condrocitos. En algunas materializaciones, las células o cultivos que se evalúan proceden de mamíferos, particularmente del hombre. En algunas materializaciones, el cultivo celular crece a partir de células liberadas de una biopsia de cartílago. Por ejemplo, en el implante de condrocitos autólogos, las células cartilaginosas usadas para el procedimiento se cultivan normalmente a partir de una biopsia de cartílago del paciente que recibe el implante. El producto Carticel@. que contiene condrocitos autólogos (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) es un ejemplo de producto a base de condrocitos cultivados. En algunas materializaciones de la invención, el cultivo celular comprende una matriz de colágeno cargada con condrocitos. Tales condrocitos pueden obtenerse a partir de una biopsia de cartílago y cultivarse antes de ser cargados en la matriz, por ejemplo, como se usan en el producto para implantes MACI@.. El método de la invención es útil para identificar y/o confirmar la identidad de las células cargadas en el soporte de colágeno antes de implantar la matriz.

25 [0057] Para ilustrar un ejemplo de la utilidad del método de determinación mediante cultivo celular, se hace referencia a la figura 1. La figura ilustra los pasos que intervienen en la producción de un producto a base de condrocitos cultivados para el implante de condrocitos autólogos, como el uso de condrocitos autólogos Carticel@., o para producir un producto a base de condrocitos cultivados para el procedimiento de implantación MACI@.. En el paso 1, se envía para su procesamiento una biopsia de cartílago de un paciente sometido a un implante de condrocitos autólogos (paso 2). El material de la biopsia es digerido en el paso 3 para liberar y recoger condrocitos del cartílago. Las células liberadas se siembran en frascos de cultivo de tejidos y se expanden en cultivo primario en el paso 4 y, si es necesario, se subcultivan. Una vez que las células alcanzan un número adecuado, opcionalmente pueden congelarse en el paso 5 hasta que el paciente esté preparado para recibir el implante. Una vez que el paciente está preparado para recibir las células, se descongelan y se siembran en frascos de cultivo de tejidos donde crecerán hasta conformar un cultivo consolidado (paso 6).

35 [0058] Para usarlas en un implante de condrocitos autólogos, si se obtiene un número suficiente de células en el cultivo consolidado, se centrifugan hasta formar un botón celular que se resuspende en medio para transporte, lo que constituye el "producto final" tal como los condrocitos autólogos Carticel@. (paso 8). El "producto final" se somete a una serie de pruebas de control de calidad, que incluyen, por ejemplo, una prueba de esterilidad, una prueba de viabilidad celular, una prueba de endotoxinas, un análisis de micoplasmas, y una prueba de composición del cultivo ("identidad del control de calidad" del paso 9, como se describe en el presente documento) para garantizar que las células cultivadas contienen un número suficiente de condrocitos. Si las células cultivadas pasan todas las pruebas del control de calidad, se envían (paso 10) al paciente para su implantación (paso 11).

45 [0059] De forma alternativa, cuando el cultivo consolidado en el paso 6 va a ser usado en un implante MACI@., se resuspenden las células en medio de cultivo, se siembran en una estructura de colágeno, y se cultivan durante 4 días (paso 7). Al final del periodo de cultivo, las células se lavan con medio para transporte para obtener el producto final para implantes MACI@.. Este producto también se somete a las pruebas de control de calidad antes señaladas. En consecuencia, si el producto final es una suspensión de condrocitos cultivados, como los condrocitos autólogos Carticel@., o el producto final es un producto para implantes MACI@. sembrado en una estructura, el método de la invención es útil como ensayo de identificación de lote o ensayo de lanzamiento de lote, para confirmar la composición de un cultivo celular como que contiene condrocitos antes del envío del cultivo. Por ejemplo, la "identidad del control de calidad" (paso 9) puede realizarse en cualquier paso previo al producto final consolidado, por ejemplo, antes del paso 4, 5, 6, 7 u 8.

55 [0060] Muchos métodos de determinación de los niveles de expresión génica o de proteínas son conocidos por las personas experimentadas en el campo, por ejemplo, como se describe en Sambrook y cols., (eds.) *Clonación: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y cols. (eds.) Nueva York: John Wiley and Sons, 1998). Ejemplos de tales métodos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (incluida la cuantificación absoluta por PCR, la PCR en tiempo real (RT-PCR) y la qRT-PCR, PCR multiplex o singleplex), PCR con una sola célula, análisis northern blot, ensayos de protección de la nucleasa,

ensayos de hibridación in situ, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de inmunocitoquímica, ensayos de electroforesis como en gel o capilar, análisis Western blot, ELISA, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos basados en cromatografía como HPLC o cromatografía en gel, ensayos de espectrometría de masas, ensayos de protección de RNasa, ensayos de citometría de flujo, ensayos de metilación del ADN, y análisis de modificación de histonas.

5 [0061] En todos los métodos de la invención, los niveles de expresión, a nivel del ARN o a nivel proteínico, pueden determinarse usando cualquier método apropiado, incluido cualquiera de los métodos convencionales. Los niveles de ARN pueden determinarse mediante, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa (por ejemplo, TaqMan™ RT-PCR o RT-PCR), Northern blotting, o cualquier otro método para determinar los niveles de ARN, o como se describe en los Ejemplos. Los niveles de proteína pueden determinarse, por ejemplo, usando Western blotting, ELISA citometría de flujo, ensayos de actividad enzimática, o cualquier otro método para determinar los niveles de proteínas. Los niveles de expresión pueden escalarse y/o normalizarse según la cantidad total de ARN o proteína que contiene la muestra y/o un control, que puede ser típicamente un gen doméstico como la beta-actina o gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa (GAPDH), o ARN ribosómico 18S, etc.). La normalización se lleva a cabo típicamente para explicar la variación en la cantidad introducida de proteína, ADN o ARN. Por ejemplo, en los Ejemplos, los niveles de expresión son normalizados según el ARN ribosómico 18S usando una curva estándar.

20 [0062] En materializaciones ilustrativas, los niveles de expresión de los marcadores fibroblásticos y condrocitarios se determinan mediante RT-PCR, ya sea con una curva estándar o con un método C_T comparativo para una cuantificación relativa. En algunas materializaciones, la cuantificación absoluta de los números de copias de los marcadores puede determinarse preparando curvas estándares usando cantidades conocidas de los marcadores. Los métodos generales para llevar a cabo tales ensayos se describen, por ejemplo, en sistemas de PCR en tiempo real: Sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT y sistema de PCR en tiempo real 7300/7500 de Applied Biosystems, Guía química, Applied Biosystems, 2005, Parte N.º 4348358 Rev. E.

25 [0063] En el caso de comparar dos marcadores usando el método C_T comparativo, la grado de proporción de los niveles de expresión de un marcador fibroblástico respecto al de un marcador condrocitario puede calcularse como $(1 + E)^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$, donde $C_{T,f}$ es el número de ciclos de umbral del marcador fibroblástico, $C_{T,c}$ es el número de ciclos umbral del marcador condrocitario, suponiendo que la eficiencia de la amplificación (E) es la misma para ambos marcadores y la cantidad inicial de ambos marcadores se normaliza según la misma cantidad del control endógeno (por ejemplo, como en dos muestras duplicadas). En el caso de $E \approx 1$, como se ilustra en los Ejemplos, la proporción puede ser aproximadamente de $2^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$. De lo contrario, los cálculos pueden realizarse como se describe en el Apéndice A de los Sistemas de PCR en tiempo real: Sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT y sistema de PCR en tiempo real 7300/7500 de Applied Biosystems, Guía química, Applied Biosystems, 2005, Parte N.º 4348358 Rev. E.

[0064] Se ilustran materializaciones posteriores de la invención en los ejemplos siguientes, lo que se hace con la intención de ejemplificar y no se hace para limitarse al ámbito de la invención.

EJEMPLOS

35 Ejemplo 1: Expresión de HAPLN1 y MFAP5 en condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos

40 [0065] *Aislamiento y cultivo celular* -- Los cultivos de condrocitos humanos fueron aislados a partir de cartilago usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel®. o el método de las proteasas para producir condrocitos cultivados. Usando el método de producción de los condrocitos autólogos Carticel®, el tejido cartilaginoso fue desprovisto de hueso y sinovial y se sometió a una primera digestión en la que el tejido fue tratado enzimáticamente en una solución de colagenasa durante 18 horas a 37 °C. Las células liberadas en la primera digestión se siembran en frascos de cultivo de tejidos con suero bovino fetal (FBS) y medio con gentamicina (EGHXX). A continuación, las células eran sometidas a una segunda digestión en la que el tejido restante de la primera digestión se trataba con una solución de colagenasa/tripsina durante 2,5 horas a 37 °C. Las células liberadas en la segunda digestión se sembraban en frascos de cultivo de tejidos con EGHXX. Los trozos de tejido restantes tras la segunda digestión se sembraban en frascos de cultivo de tejidos con EGHXX. Cuando se usó el método de aislamiento de proteasas, el tejido cartilaginoso fue desprovisto de hueso y sinovial y se sometió a una primera digestión en una solución de Pronasa E (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) durante 1,5 horas a 37 °C. A continuación, se eliminó la solución de pronasa y se realizó una segunda digestión del cartilago en una solución de colagenasa durante 18 horas a 37 °C. Las células liberadas fueron sembradas en frascos de cultivo de tejidos con EGHXX. Tras el aislamiento, los métodos de cultivo celular fueron los mismos para las células, independientemente del método de aislamiento con el que se obtuvieron. Los cultivos celulares primarios fueron realimentados con EGHXX fresca cada 2 a 4 días. Cuando los frascos de cultivos primarios alcanzaron del 50 al 80 % de confluencia, fueron tripsinizados en una única suspensión celular, neutralizados con EGHXX para inactivar la tripsina, y se efectuó un recuento celular. A continuación, la suspensión celular resultante fue o bien analizada tomando una muestra y, posteriormente expandida mediante subcultivo, o congelada para su almacenamiento a largo plazo. El subcultivo del cultivo primario se denomina cultivo secundario o primera transferencia. A los subcultivos sucesivos se les denominará segunda transferencia, tercera transferencia, cuarta transferencia, etc. Los subcultivos se efectuaron sembrando células en frascos de cultivo de tejidos con EGHXX y realimentando con RGHXX fresca cada 2 a 4 días. Cuando los subcultivos alcanzaron del 80 al 100 % de confluencia, fueron tripsinizados

en una única suspensión celular, neutralizados con EGHXX para inactivar la tripsina, y se efectuó un recuento celular. A continuación, la suspensión celular resultante fue o bien analizada tomando una muestra, posteriormente expandida, o congelada para su almacenamiento a largo plazo.

5 [0066] Los cultivos de sinoviocitos humanos (cultivos celulares derivados de la sinovial, también conocidos como fibroblastos sinoviales) S1 y S2 se obtuvieron de Cell Applications Inc. (San Diego, CA) como cultivos celulares primarios congelados. Los sinoviocitos fueron sembrados en frascos de cultivo de tejidos con medio EGHXX y cultivados usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@., como se describió anteriormente. Los cultivos de fibroblastos dérmicos humanos fueron adquiridos a Cell Applications Inc. como cultivos celulares primarios congelados. Los fibroblastos dérmicos fueron cultivados usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@., como se describió anteriormente.

10 [0067] Los cultivos celulares usados en este ejemplo se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2: Cultivos celulares usados en el análisis por RT-PCR (Ejemplo 1)

Cultivo celular	Tipo de célula	Tipo de cultivo celular
CP	Condrocito	Cultivo primario
C1	Condrocito	Segunda transferencia
C2	Condrocito	Segunda transferencia
S1	Sinoviocito	Segunda transferencia
S2	Sinoviocito	Segunda transferencia
F1	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F2	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia

15 [0068] *Preparación de ARN y cDNA* -- El ARN se aisló a partir de cultivos celulares usando el método TRI-spin (Reno y cols., *Biotechniques* 22: 1082-6 (1997)). Las concentraciones del ARN aislado se determinaron mediante espectrofotometría. Para la preparación del cDNA a partir de las muestras PC, C1, C2, S1, S2, F1, y F2, se usó el kit para la síntesis de la primera cadena (Roche, Indianápolis, IN), usando cebadores de hexámero aleatorio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se almacenó a -20 °C o -80 °C hasta el análisis.

20 [0069] *Análisis de la expresión génica* -- El análisis de la expresión génica se llevó a cabo usando la RT-PCR en tiempo real cuantitativa, ya usando un método de curva estándar, ya un método C_T comparativo. El método de la PCR en tiempo real estaba basado en la división 5' nucleasa de una oligosonda dual marcada que informa de la amplificación del cebador específico de secuencia de la secuencia diana (ensayo "TaqMan™"). La expresión de los genes que codifican la proteína de unión del cartílago (HAPLN1) y la proteína microfibrilar asociada 5 (MFAP5) se analizaron usando las pruebas de expresión génica Hs00157103_m1 y Hs00185803_m1 TaqMan™ (Applied Biosystems Inc.), respectivamente. La PCR en tiempo real se preparó con la mezcla maestra para PCR universal TaqMan™, sin UNG (N.º de catálogo 4324018, Applied Biosystems Inc.), la prueba de expresión génica TaqMan™ pertinente (Applied Biosystems) y el cDNA de muestra se usaron de acuerdo con el protocolo de mezcla para PCR universal. Las amplificaciones se pasaron por un sistema para PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems Inc.) usando el ciclo y el programa de recogida de datos TaqMan™ estándares para esta configuración. Las reacciones de 25 µl se pasaron por duplicado, introduciéndose hasta 5 ng de cDNA por pocillo. Para todos los ensayos se usó un umbral de 0,1 unidades.

30 [0070] *Método de la curva estándar* -- El método de la curva estándar se llevó a cabo usando el ensayo de control endógeno de rRNA 18S Eukaryotic (N.º de catálogo 4319413E, Applied Biosystems Inc.), en donde se usa rRNA 18S como control interno para normalizar los resultados de la RT-PCR para explicar las variaciones en la entrada. Para cuantificar los niveles relativos de expresión de cada gen, se pasaron diluciones de cDNA de condrocitos primarios (CP) para generar una curva estándar con el software del sistema 7500. El nivel de expresión de la muestra en cada análisis se determinó a partir de la curva estándar, y las proporciones de mRNA resultantes respecto al control de condrocitos primarios (CP) se dividió por la proporción de rRNA 18S de la muestra respecto a los CP para normalizar la carga de cDNA.

35 [0071] *Método C_T comparativo* -- El análisis C_T comparativo se llevó a cabo para determinar las proporciones de la expresión génica relativa de HAPLN1 respecto a MFAP5 en las distintas muestras a partir de los datos en bruto generados en el análisis de la expresión génica en la RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El método C_T

comparativo constituye una medida relativa de la proporción de HAPLN1 respecto a MFAP5, lo que permite la comparación directa entre las muestras a analizar sin necesidad de estándares, análisis de curvas estándar ni calibradores reales. Este método puede emplearse en el caso de los ensayos de HAPLN1 y MFAP5 usados en este ejemplo porque se cumplieron las cuatro condiciones siguientes: 1) el funcionamiento del ensayo fue consistente entre una pasada y otra; 2) se usaron cantidades equivalentes de ARN en los ensayos de HAPLN1, MFAP5 y del control endógeno; 3) el valor C_T para el gen del control endógeno, rRNA 18S, siempre fue inferior al C_T para HAPLN1 o al C_T para MFAP5 cuando se usaron cantidades equivalentes de ARN en cada ensayo y, por tanto, el C_T 18S siempre fue cuantificable cuando HAPLN1 o MFAP5 fueron cuantificables; y 4) el método un calibrador teórico seleccionada arbitrariamente, definido como una muestra teórica que contiene la proporción HAPLN1 / MFAP5 que produjo un valor HAPLN1 C_T igual al valor MFAP5 C_T cuando se cumplieron las otras tres condiciones antes expuestas. La derivación de la ecuación usada para este método C_T comparativo es la siguiente. Donde la cantidad de gen diana en una muestra, normalizada para un gen de control endógeno y relativa a un calibrador viene dada por:

$$(1+E)^{-\Delta\Delta C_{T, \text{gen diana}}}$$

en donde

15 E = eficiencia de la amplificación

en donde

$$\Delta\Delta C_{T, \text{gen diana}} = \Delta C \text{ de la muestra}_{T, \text{gen diana}} - \Delta C \text{ del calibrador}_{T, \text{gen diana}}$$

y en donde

$$\Delta C_{T, \text{gen diana}} = C_{T, \text{gen diana}} - C_{T, \text{gen de control endógeno}}$$

20 (Ver Liu, W. y Saint, D.A., Analytical Biochemistry, 302: 52-59 (2002); Livak, K.J, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2, ABI publication 4303859, 1997). Así pues, la proporción de HAPLN1 respecto a MFAP5 puede describirse como:

$$(1+E)^{-\Delta\Delta C_{T, \text{HAPLN1}}} / (1+E)^{-\Delta\Delta C_{T, \text{MFAP5}}}$$

que es igual a:

25 $(1+E)^{-\{[\text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}} - \text{muestra } C_{T, \text{gen de control endógeno}}] - [\text{calibrador } C_{T, \text{HAPLN1}} - \text{calibrador } C_{T, \text{gen de control endógeno}}]\}} / (1+E)^{-\{[\text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}} - \text{muestra } C_{T, \text{gen de control endógeno}}] - [\text{calibrador } C_{T, \text{MFAP5}} - \text{calibrador } C_{T, \text{gen de control endógeno}}]\}}$

Si se pasa la misma cantidad de muestra en todos los ensayos, la C_T del gen de control endógeno de la muestra puede representarse por el término x . Si se pasa la misma cantidad de calibrador en todos los ensayos, la C_T del gen de control endógeno del calibrador puede representarse por el término y . Sustituyendo estos términos, la ecuación queda de la forma siguiente:

30 $(1+E)^{-\{[\text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}} - x] - [\text{calibrador } C_{T, \text{HAPLN1}} - y]\}} / (1+E)^{-\{[\text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}} - x] - [\text{calibrador } C_{T, \text{MFAP5}} - y]\}}$

que es igual a:

$$(1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}}] - [y - \text{calibrador } C_{T, \text{HAPLN1}}]} / (1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}}] - [y - \text{calibrador } C_{T, \text{MFAP5}}]}$$

35 Si el calibrador se define como una muestra teórica que contiene la proporción de HAPLN1 / MFAP5 que produce un valor $C_{T, \text{HAPLN1}}$ igual al valor $C_{T, \text{MFAP5}}$ cuando se pasan cantidades equivalentes de calibrador en todos los ensayos, el término z puede sustituirse por el calibrador $C_{T, \text{HAPLN1}}$ y el calibrador $C_{T, \text{MFAP5}}$. La ecuación queda de la forma siguiente:

$$(1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}}] - [y - z]} / (1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}}] - [y - z]}$$

que es igual a:

$$(1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}}] - [y - z] - [x - \text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}}] + [y - z]}$$

40 que es igual a:

$$(1+E)^{[x - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}}] - [x - \text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}}]}$$

que es igual a:

$$(1+E)^{(\text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}} - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}})}$$

Y si $E = 1$ (100 % de eficiencia), la proporción relativa de HAPLN1 respecto a MFAP5 es igual a:

45 $2^{(\text{muestra } C_{T, \text{MFAP5}} - \text{muestra } C_{T, \text{HAPLN1}})}$

Las ecuaciones anteriores conducen a una fórmula final que deja sólo dos variables, C_T de la muestra HAPLN1 y C_T de la muestra MFAP5, como incógnitas. Esta fórmula se aplica cuando las muestras se analizan en las condiciones antes descritas, y el calibrador teórico empleado se establece como se describió más arriba.

5 [0072] La figura 2 describe el nivel de expresión de HAPLN1 en varias cepas celulares determinadas mediante un método de curva estándar de RT-PCR. La figura 3 describe los niveles de expresión de MFAP5 en las mismas muestras celulares como se muestra en la figura 2, según se determinó mediante un método de curva estándar de RT-PCR. HAPLN1 se expresó a mayores niveles en los cultivos celulares de condrocitos que en los cultivos celulares de sinoviocitos y fibroblastos. HAPLN5 se expresó a mayores niveles en los cultivos celulares de sinoviocitos y fibroblastos que en los cultivos celulares de condrocitos.

10 [0073] La figura 4 describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 de las figuras 2 y 3. La proporción en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

15 [0074] La figura 5 describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 2, sin embargo, los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR. Los resultados del método C_T fueron similares a los resultados obtenidos por el método de la curva estándar.

Ejemplo 2: Expresión de HAPLN1 y MFAP5 en cepas adicionales de condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos

20 [0075] Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron cultivos celulares adicionales para confirmar la fidelidad del método para distinguir entre los cultivos de condrocitos y sinoviocitos. Los cultivos usados en este ejemplo se enumeran en la tabla 3.

Tabla 3: Cultivos celulares usados en el análisis por RT-PCR (Ejemplo 2)

Cultivo celular	Tipo de célula	Tipo de cultivo celular
CP	Condrocito	Cultivo primario
C3	Condrocito	Segunda transferencia
C4	Condrocito	Segunda transferencia
C5	Condrocito	Segunda transferencia
C6	Condrocito	Segunda transferencia
C7	Condrocito	Segunda transferencia
S3	Sinoviocito	Segunda transferencia
S4	Sinoviocito	Segunda transferencia
S5	Sinoviocito	Segunda transferencia
S6	Sinoviocito	Segunda transferencia
S7	Sinoviocito	Segunda transferencia

25 [0076] *Aislamiento y cultivo celular* -- Cultivos celulares de condrocitos humanos C3, C4, C5, C6, y C7 se aislaron y cultivaron usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@. como se describe en el Ejemplo 1. Los cultivos de sinoviocitos humanos (cultivos celulares derivados de la sinovial, también conocidos como fibroblastos sinoviales) fueron obtenidos a partir de Genzyme o a partir de Cell Applications Inc. (San Diego, CA). Las cepas S4, S6, y S7 fueron aisladas en Genzyme usando diversos procedimientos. S4 se aisló sometiendo tejido sinovial picado a digestión en solución de colagenasa durante 3,5 horas a 37 °C, seguida de una segunda digestión en solución de tripsina durante 1 hora a 37 °C. La cepa S6 se aisló sometiendo tejido sinovial picado a digestión en una solución con colagenasa y DNasa durante 2 horas a 37 °C. La cepa S7 se aisló sometiendo tejido sinovial picado al método de producción de condrocitos autólogos Carticel@.. Tras ser aislados, las células procedentes de la sinovial fueron sembrados en frascos de cultivo de tejidos con medio EGHXX y cultivados usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@., como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Las cepas S3 y S5 fueron adquiridas en Cell Applications Inc. como cultivos celulares de primera transferencia congelados. Tras descongelarlas,

30

35

las células de las cepas S3 y S5 fueron sembradas en frascos de cultivo de tejidos con medio EGHXX y cultivados usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@, como se describió en el Ejemplo 1.

5 [0077] *Aislamiento de ARN y preparación de cDNA* -- Las preparaciones de ARN para cultivos celulares de condrocitos C3, C4, C5, C6, y C7 y cultivos de sinoviocitos S3, S4, S5, S6, S7 se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1. El ARN procedente de estas muestras fue retrotranscrito a cDNA usando el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este ejemplo se usó el cDNA de CP del ejemplo 1. El cDNA se almacenó a -20 °C o -80 °C hasta el análisis.

[0078] *Análisis de la expresión génica* -- El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante RT-PCR como se describe en el ejemplo 1.

10 [0079] La figura 6 describe los niveles de expresión de HAPLN1 en un número de cepas adicionales de condrocitos y sinoviocitos. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR y normalizado según el ARN ribosómico 18S.

15 [0080] La figura 7 describe los niveles de expresión de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 6. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR y normalizado según el ARN ribosómico 18S.

[0081] La figura 8 describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 de las figuras 6 y 7. La proporción en los condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

20 [0082] La figura 9 describe los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en la figura 6. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

[0083] Los resultados de la RT-PCR en las cepas celulares adicionales fueron consistentes con los resultados obtenidos en el ejemplo 1.

25 **Ejemplo 3: Expresión de HAPLN1 y MFAP5 en condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos usando cebadores y sondas diseñados a medida**

[0084] El análisis de varios cultivos de condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos dérmicos se llevo a cabo con cebadores y sondas de secuencias conocidas de oligonucleótidos.

30 [0085] *Aislamiento y cultivo celular* -- Las cepas celulares usadas en este ejemplo se enumeran a continuación en las tablas 4 y 5. Los cultivos celulares de condrocitos humanos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C26, C28, C30 y C34 se aislaron y cultivaron usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@, como se describe en el Ejemplo 1. Los cultivos celulares de condrocitos humanos C21, C22, C23, C24, C25, C27, C29, C31, C32, y C33 se aislaron (usando el método de la proteasa) y cultivaron como se describe en el Ejemplo 1. Los métodos de aislamiento y cultivo celular para los cultivos de sinoviocitos humanos S1, S2, S3, S4, S5, S6, y S7 se describieron en los ejemplos 1 y 2. El cultivo de sinoviocitos S9 se aisló sometiendo tejido sinovial picado a digestión en una solución con colagenasa y DNasa durante 2 horas a 37 °C. El cultivo de sinoviocitos S10 se aisló sometiendo tejido sinovial picado a digestión en solución de colagenasa durante 3,5 horas a 37 °C, seguida de una segunda digestión en solución de tripsina durante 1 hora a 37 °C. Las cepas de sinoviocitos S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, y S18 fueron adquiridas en Cell Applications Inc. como cultivos celulares de primera transferencia congelados. Las cepas de fibroblastos dérmicos F1, F2, F3, F4, F5, F6, F8, F9, F10, y F11 fueron adquiridas a Cell Applications Inc. como cultivos celulares primarios congelados. Todos los cultivos celulares se cultivaron usando el método de producción de condrocitos autólogos Carticel@, como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 4: Primer conjunto de cultivos celulares usados en el análisis por RT-PCR (Ejemplo 3)

Cultivo celular	Tipo de célula	Tipo de cultivo celular
C1	Condrocito	Segunda transferencia
C2	Condrocito	Segunda transferencia
C3	Condrocito	Segunda transferencia
C4	Condrocito	Segunda transferencia
C5	Condrocito	Segunda transferencia
C6	Condrocito	Segunda transferencia

C7	Condrocito	Segunda transferencia
C8	Condrocito	Segunda transferencia
S1	Sinoviocito	Segunda transferencia
S2	Sinoviocito	Segunda transferencia
S3	Sinoviocito	Segunda transferencia
S4	Sinoviocito	Segunda transferencia
S5	Sinoviocito	Segunda transferencia
S6	Sinoviocito	Segunda transferencia
S7	Sinoviocito	Segunda transferencia
S9	Sinoviocito	Primera transferencia
S10	Sinoviocito	Tercera transferencia
S11	Sinoviocito	Tercera transferencia
S12	Sinoviocito	Tercera transferencia
S13	Sinoviocito	Tercera transferencia
F1	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F2	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F3	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F4	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F5	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F6	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia

Tabla 5: Segundo conjunto de cultivos celulares usados en el análisis por RT-PCR (Ejemplo 3)

Cultivo celular	Tipo de célula	Tipo de cultivo celular
C21	Condrocito	Segunda transferencia
C22	Condrocito	Segunda transferencia
C23	Condrocito	Segunda transferencia
C24	Condrocito	Segunda transferencia
C25	Condrocito	Segunda transferencia
C26	Condrocito	Segunda transferencia
C27	Condrocito	Segunda transferencia
C28	Condrocito	Segunda transferencia
C29	Condrocito	Segunda transferencia
C30	Condrocito	Segunda transferencia
C31	Condrocito	Segunda transferencia
C32	Condrocito	Segunda transferencia
C33	Condrocito	Segunda transferencia
C34	Condrocito	Segunda transferencia

S14	Sinoviocito	Tercera transferencia
S15	Sinoviocito	Tercera transferencia
S16	Sinoviocito	Tercera transferencia
S17	Sinoviocito	Segunda transferencia
S18	Sinoviocito	Segunda transferencia
F8	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F9	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F10	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F11	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia

[0086] *Aislamiento de ARN y preparación de cDNA* -- Las preparaciones de ARN para las cepas de condrocitos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, la cepas de sinoviocitos S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, y cepas de fibroblastos dérmicos F1 y F2 se describieron en los ejemplos 1 y 2. Para la preparación de ARN de la cepas de condrocitos C8, las cepas de sinoviocitos S9, S10, S11, S12, S13, S14, cepas de fibroblastos dérmicos F3, F4, F5 y F6, y todas las cepas enumeradas en la tabla 5, se uso el método de aislamiento de ARN RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Para el aislamiento con RNeasy™, se añadieron 360 µl de solución lítica a botones celulares que contenían hasta un millón de células. Las muestras fueron inmediatamente resuspendidas en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y, a continuación llevadas a 37 °C durante 5 minutos. Tras la incubación, se agitaron las muestras a mano durante 10 segundos, seguidos de otros 30 segundos de vórtex a máxima velocidad. Se recogió el contenido de cada tubo, y se pasó el lisado a través de una columna Qiasredder™ (Qiagen). En el procedimiento RNeasy™ se usaron trescientos veinticinco µl de lisado Qiasredder RNeasy™ siguiendo el protocolo del fabricante para aislar el ARN de células animales. Las columnas se eluyeron con una sola elución consistente en 30 µl de agua. El ARN fue retrotranscrito a cDNA usando el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se almacenó a -20 °C o -80 °C hasta el análisis.

[0087] *Análisis de la expresión génica* -- Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo con cebadores y sondas específicos para las regiones del ARNm de HAPLN1 y MFAP5, diseñados a medida. La información de la secuencia de los cebadores y sondas diseñados a medida se muestra en la tabla 6. Abreviaturas: 6FAM = 6-carboxifluoresceína, VIC™ es una marca comercial de Applied Biosystems Inc. y es un fluoróforo, MGBNFQ = fijador de surco con menor extintor no fluorescente. Los cebadores se obtuvieron de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Las sondas se obtuvieron en Applied Biosystems Inc. Para HAPLN1, la diana del cebador directo son los nucleótidos 543 a 570 de la secuencia de HAPLN1 depositada en GenBank con el N.º de aceptación NM_001884.2 (SEQ ID NO:2), la diana del cebador inverso son los nucleótidos 603 a 622, y la diana de la sonda son los nucleótidos 584 a 601 de la misma secuencia. Para MFAP5, la diana del cebador directo son los nucleótidos 301 a 322 de la secuencia de MFAP5 depositada en GenBank con el N.º de aceptación NM_003480.2 (SEQ ID NO:1); la diana del cebador inverso son los nucleótidos 353 a 372, y la diana de la sonda son los nucleótidos 334 a 350 de la misma secuencia. La PCR en tiempo real se preparó con la mezcla maestra para PCR universal TaqMan™, sin UNG (N.º de catálogo 4352042, Applied Biosystems Inc.), cebadores de 900 nM, sondas de 250 nM, y hasta 5 ng de cDNA de muestra, de acuerdo con el protocolo rápido de mezcla para PCR universal TaqMan™. El volumen de la reacción fue de 13 µl y las amplificaciones se pasaron por un sistema para PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems Inc.) usando el ciclado y el programa de recogida de datos TaqMan™ predeterminados para esta configuración. Para todos los ensayos se usó un umbral de 0,1 unidades. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR según se describe en el ejemplo 1.

Tabla 6: Secuencias de cebador y sonda diseñadas a medida

Marcador	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
HAPLN1	5' TGAAGGATTAGAAG ATGATACTGTTGTG 3' (SEQ ID NO:16)	5' GCCCCAGTCG TGGAAAGTAA 3' (SEQ ID NO:17)	5' VIC / TACAAGGTGTGGTATTCC / MGBNFQ 3' (SEQ ID NO:18)
MFAP5	5' CGAGGAGACGA TGTGACTCAAG 3' (SEQ ID NO:19)	5' AGCGGGATCA TTCACCAGAT 3' (SEQ ID NO:20)	5' 6FAM / ACATTCACAGAAGATCC / MGBNFQ 3' (SEQ ID NO:21)

[0088] La figura 10A describe los niveles de expresión de HAPLN1 y de MFAP5 en las mismas cepas como se muestra en las figuras 2 y 6, así como cepas adicionales de condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos dérmicos que se muestran en la tabla 4. La figura 10B describe las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 en las cepas de la tabla 5. Los resultados obtenidos con los cebadores y sondas diseñados a medida fueron similares a los resultados descritos en los ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4: Comparación de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 en cultivos de condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos, en monocapas y en estructuras de colágeno

[0089] Se compararon los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 en varios tipos de cultivos en monocapas y estructuras de colágeno.

[0090] *Aislamiento y cultivo celular* -- Los cultivos de condrocitos C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, y C18 se aislaron usando el método de la proteasa como se describe en el Ejemplo 1 y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1. El cultivo de sinoviocitos S7 fue aislado y cultivado como se describe en los ejemplos 1 y 2. Los cultivos de fibroblastos dérmicos F2, y F7 fueron adquiridas a Cell Applications Inc. como cultivos celulares primarios congelados y se cultivaron como se describe en el ejemplo 1. Tras completar la segunda transferencia del cultivo (tercera transferencia para el cultivo S7), se tomó una muestra para aislar el ARN (el muestra de "Día 0" o en monocapa) y, a continuación, se resuspendieron las células en medio EGHXX y se sembraron en una estructura MAIX™ de 20 cm² (membrana de colágeno ACI- MAIX™, CE, Matricel GmbH, D-52134 Herzogenrath, Alemania). La células se dejaron fijándose durante 1 hora a 37 °C y, a continuación, se alimentó la estructura con más EGHXX y se cultivaron durante 4 días. Los cultivos en estructuras que contenían sinoviocitos y fibroblastos dérmicos también se prepararon de la misma manera. Después de 4 días de cultivo en estructura, se obtuvieron muestras de los cultivos con una aguja de biopsia de 8 mm (muestra del "Día 4" o de estructura) y se llevó a cabo el aislamiento del ARN.

[0091] *Aislamiento de ARN y preparación de cDNA* -- El ARN se aisló usando el mini-kit RNeasy™ (Qiagen, Valencia, CA). Para el aislamiento con RNeasy™, se añadieron 360 µl de solución lítica a las muestras para implantes MACI@. (hasta dos punciones de 8 mm para implantes MACI@. por preparación). Las muestras fueron inmediatamente resuspendidas en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y, a continuación llevadas a 37 °C durante 5 minutos. Tras la incubación, se agitaron las muestras a mano durante 10 segundos para desplegar las membranas, seguidos de otros 30 segundos de vórtex a máxima velocidad. Se recogió el contenido de cada tubo, y se pasó el lisado a través de una columna Qiasredder (Qiagen). En el procedimiento RNeasy™ se usaron trescientos veinticinco µl de lisado Qiasredder RNeasy™ siguiendo el protocolo del fabricante para aislar el ARN de células animales. Las columnas se eluyeron con una sola elución consistente en 30 µl de agua. La preparación del cDNA a partir de la muestra de ARN se llevó a cabo usando el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA se almacenó a -20 °C o -80 °C.

[0092] Los cultivos celulares usados y las configuraciones usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla

Tabla 7: Cultivos celulares usados en el análisis por RT-PCR (Ejemplo 4)

Código del cultivo	Tipo de célula	Tipo de cultivo	Configuración
C9 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C10 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C11 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C12 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C13 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C14 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C15 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C16 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C17 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C18 día 0	Condrocito	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
S7 día 0	Sinoviocito	Tercera transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
F7 día 0	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
F2 día 0	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia	5 X 10 ⁵ botón celular
C9 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C10 día 4	Condrocito	Implante@. MACI	Punción de 8 mm
C11 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C12 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C13 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C14 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C15 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C16 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C17 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
C18 día 4	Condrocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
S7 día 4	Sinoviocito	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
F7 día 4	Fibroblasto dérmico	Implante @.MACI	Punción de 8 mm
F2 día 4	Fibroblasto dérmico	Implante @.MACI	Punción de 8 mm

5 [0093] *Análisis de la expresión génica* -- El análisis de la expresión génica del implante cDNA monocapa y MACI@. se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1.

10 [0094] La figura 11 muestra una comparación entre las proporciones del nivel de expresión para HAPLN1 y MFAP5 en cultivos monocapa y con estructura de colágeno. Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron mediante un método de curva estándar de RT-PCR,. Los niveles de expresión fueron normalizados según el ARN ribosómico 18S. La proporción en cultivo monocapa de condrocitos primarios (CP) se escaló a 1; las otras proporciones se escalaron en consecuencia.

[0095] La figura 12 muestra una comparación entre las proporciones del nivel de expresión para HAPLN1 y MFAP5 en cultivos monocapa y con estructura de colágeno usando las mismas cepas como se muestra en la figura 11. Los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR, y las proporciones se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

15 [0096] Los resultados obtenidos en cultivos en estructura fueron similares a los obtenidos en cultivos monocapa.

Ejemplo 5: Expresión de HAPLN1 y MFAP5 en función del número de transferencias

[0097] Se estudió la proporción de HAPLN1 respecto a MFAP5 en varias fases del cultivo.

20 [0098] *Aislamiento y cultivo celular* -- Los cultivos de condrocitos C19, C20, C31, C32 y C33 se aislaron usando el método de la proteasa como se describe en el Ejemplo 1 y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1.

Los cultivos de sinoviocitos S6 y S7 fueron aislados y cultivados como se describe en los ejemplos 1 y 2. El cultivo de sinoviocitos S8 se aisló sometiendo tejido sinovial picado a digestión en una solución con colagenasa y DNasa durante 2 horas a 37 °C. El cultivo de S8 se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1. Para los cultivos de condrocitos C19, C20, C31, C32, y C33, se tomaron muestras de células procedentes de cartílago (marcadas como "0" en las figuras 14A y 14B), cultivos celulares primarios (marcadas como "1" en las figuras 14A y 14B), células de primera transferencia (marcadas como "2" en las figuras 14A y 14B), y células de segunda transferencia (marcadas como "3" en las figuras 14A y 14B). Para el cultivo de sinoviocitos S7, se tomaron muestras de cultivos primarios (marcados como "1" en la figura 13), células de primera transferencia (marcadas como "2" en la figura 13), de segunda transferencia (marcadas como "3" en la figura 13), de tercera transferencia (marcadas como "4" en la figura 13), y de cuarta transferencia (marcadas como "5" en la figura 13). Para los cultivos de sinoviocitos S6 y S8, se tomaron muestras de primera transferencia (marcadas como "2" en la figura 13), de segunda transferencia (marcadas como "3" en la figura 13), de tercera transferencia (marcadas como "4" en la figura 13), y de cuarta transferencia (marcadas como "5" en la figura 13).

[0099] *Aislamiento de ARN y preparación de cDNA* -- El ARN y el cDNA se prepararon usando el mini-kit RNeasy™ (Qiagen) el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems Inc.) como se describe en el ejemplo 3.

[0100] *Análisis de la expresión génica* -- El análisis de expresión génica de las muestras de sinoviocitos se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1. El análisis de expresión génica de las muestras de condrocitos se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 3.

[0101] Las figuras 13, 14A y 14B describen el cambio en las proporciones del nivel de expresión de HAPLN1 y MFAP5 como una función del número de transferencias. Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR. Las proporciones HAPLN1:MFAP5 se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

[0102] Las proporciones de HAPLN1 respecto a MFAP5 fueron consistentemente bajas en todos los niveles de cultivo para las muestras de sinoviocitos respecto a las muestras de condrocitos. Las proporciones de HAPLN1 respecto a MFAP5 fueron consistentemente bajas en todos los niveles de cultivo para las muestras de condrocitos respecto a las muestras de sinoviocitos.

Ejemplo 6: Expresión de HAPLN1 y MFAP5 en cultivos celulares mixtos

[0103] Se aplicó un análisis de expresión génica a los cultivos mixtos de condrocitos y sinoviocitos para evaluar el nivel de sensibilidad del método en los cultivos mixtos. Los cultivos celulares de condrocitos humanos y de sinoviocitos humanos se usaron para preparar mezclas de los dos tipos celulares en las proporciones siguientes:

- 1) 0 % condrocitos / 100 % sinoviocitos;
- 2) 25 % condrocitos / 75 % sinoviocitos;
- 3) 50 % condrocitos / 50 % sinoviocitos;
- 4) 75 % condrocitos / 25 % sinoviocitos; y
- 5) 100 % condrocitos / 0 % sinoviocitos.

[0104] *Aislamiento y cultivo celular* -- Las cepas de condrocitos C5, C6, y C8 se aislaron y cultivaron como se describe en los ejemplos 1 y 2. Los cultivos de sinoviocitos S6, S7 y S8 se aislaron y cultivaron como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3. Para el experimento mixto 1, se usaron cultivos de segunda transferencia de la cepa 6 de condrocitos (C6) y de la cepa 6 de sinoviocitos (S6). Para el experimento mixto 2, se usaron cultivos de primera transferencia de la cepa 8 de condrocitos (C8) y de la cepa 7 de sinoviocitos (S7). Para el experimento mixto 3, se usaron cultivos de primera transferencia de la cepa 5 de condrocitos (C5) y de la cepa 9 de sinoviocitos (S9).

[0105] *Aislamiento de ARN y preparación de cDNA* -- El ARN y el cDNA se prepararon usando el mini-kit RNeasy™ (Qiagen) el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems Inc.) como se describe en el ejemplo 3.

[0106] *Análisis de la expresión génica* -- El análisis de la expresión génica se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 3.

[0107] Los niveles de expresión se determinaron mediante un método C_T comparativo de RT-PCR. Las proporciones HAPLN1:MFAP5 se calcularon como $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$. Los resultados de los experimentos mixtos se exponen en la figura 15, que muestra las proporciones de los niveles de expresión de HAPLN1 y MFAP5 en muestras de poblaciones mixtas de condrocitos y sinoviocitos. En los cultivos que contenían un 75 % o menos de condrocitos y un 25 % o más sinoviocitos, las proporciones de los niveles de expresión entre HAPLN1:MFAP5 fueron iguales o inferiores a 1. Proporciones mayores correspondieron a proporciones mayores de condrocitos en las muestras analizadas. La capacidad del ensayo para discernir mezclas de cultivos celulares mostró que, en promedio, las muestras compuestas por al menos 67 % de condrocitos con un equilibrio consistente de fibroblastos sinoviales para producir un $C_{T, MFAP5}$ -

C_{T,HAPLN1} positivo. La contaminación por otros tipos celulares, como fibroblastos dérmicos, también pueden detectarse con este ensayo.

Ejemplo 7: Análisis de la relación entre la respuesta del ensayo y la proporción molecular de los marcadores

5 [0108] Se emplearon transcripciones de ARN sintético de HAPLN1 y MFAP5 para determinar la relación entre la
 10 respuesta del ensayo y la proporción molecular de los marcadores en las muestras analizadas. En primer lugar, la PCR
 primaria (Platinum PCR Supermix, número de catálogo de Invitrogen 11306-016) se llevó a cabo sobre cDNA humano
 usando los cebadores enumerados en la tabla 8. Para HAPLN1, estos cebadores amplificaron nucleótidos desde las
 15 posiciones 256 a 1171 del gen HAPLN1 (N.º de aceptación NM_001884.2). Para MFAP5, estos cebadores amplificaron
 nucleótidos desde las posiciones 32 a 728 del gen MFAP5 (N.º de aceptación NM_003480.2). Los productos de la PCR
 se analizaron en geles de agarosa con EDTA tris-acetato (TAE) al 1,5 % usando una escalera alélica de 100 bases de
 20 dimensión molecular (regla molecular PCR de 100 bp, número de catálogo de BioRad 170-8206) como referencia y
 tinción en gel SYBR Green I (número de catálogo de Invitrogen S-7563). Los amplicones primarios resultantes fueron
 purificados en gel con geles de poliacrilamida (por determinar) con EDTA tris-borato nativo al 4 % (PAGE) y se usaron
 como plantilla para PCR secundaria con los cebadores que se enumeran en la tabla 8. La plantilla de amplicón primario
 purificada en gel para la amplificación secundaria del MFAP5 se cargó con 0,56 ng por cada 200 µl de reacción
 25 secundaria. La plantilla de amplicón primario purificada en gel para la amplificación secundaria del HAPLN1 se cargó
 con 2,5 ng por cada 900 µl de reacción secundaria. Los amplicones secundarios se purificaron a partir de geles PAGE
 TBE nativos según se describió y se usaron como plantillas para la transcripción in vitro con un kit Ambion Megascript
 T7. Se usaron hasta 1,3 µg de plantilla para amplicón secundario por cada 20 µl de reacción de transcripción. Las
 transcripciones resultantes fueron purificadas en gel con geles de poliacrilamida TBE-Urea (TBU) al 6 %, resuspendidas
 en EDTA 0,1 mM, y cuantificadas mediante espectrofotometría con lecturas realizadas por duplicado usando un factor
 30 de conversión de 1_{A260} unidades correspondiente a una concentración de ARN de 40 ng/µl. Las transcripciones
 purificadas en gel se analizaron en geles TBU al 6 % para evaluar su pureza. Tras la determinación de la pureza
 mediante PAGE y su cuantificación mediante espectrofotometría, se determinó el número de copias transcritas por µl
 usando los factores de conversión enumerados en la tabla 9. Estos factores de conversión suponen un peso molecular
 base promedio de 343 Daltons. Se consideró que la constante de Avogadro era 6,02 x 10²³/mol. También se supuso que
 la primera base transcrita el +1 G del promotor T7, seguida de la secuencia diana. Las transcripciones se diluyeron en
 tampón portador de ARN de levadura (solución de 20 ng/µl de ARN de levadura (número de catálogo de Ambion
 AM7120G) en nucleasa libre de agua) a concentraciones que oscilaron entre 10³ y 10⁸ copias / µl. A continuación, se
 analizaron las diluciones usando la RT-PCR descrita en el ejemplo 3 de la solicitud de patente, excepto porque se
 usaron 2 µl de cDNA por cada 13 µl de reacción PCR. A continuación se calculó la proporción de HAPLN1:MFAP5 para
 cada dilución usando el método Ct comparativo, como se describe en el ejemplo 4 de la solicitud de patente.

35 [0109] La respuesta del ensayo usando el número de copias estándar se comparó con la proporción
 molecular conocida. Estos resultados se muestran en la tabla 10. Una vez determinada la relación entre la respuesta del
 ensayo y la proporción molecular, se calcularon las proporciones moleculares exactas en varias respuestas del ensayo.
 Estos resultados, que se muestra en la tabla 11, indican que cuando los límites de aceptación determinados por Ct
 comparativa son igual a 1 (por ejemplo, cuando HAPLN1:MFAP5 = 1), se corresponden con una proporción molecular
 exacta de HAPLN1:MFAP5 de 2.212.

40 Tabla 8: Cebadores usados para la amplificación de números de copias estándares

Marcador	Cebador directo (PCR primaria)	Cebador directo (PCR secundaria)	Cebador inverso (PCR primaria y secundaria)
HAPLN1	5' GCCAAGGTGTTTT CACACAG 3' (SEQ ID NO:22)	5' TAATACGACTCACTATAGGGGC CAAGGTGTTTTCACACAG 3' (SEQ ID NO:23)	5' CTCTGAAGCAGTA GACACCA 3' (SEQ ID NO:24)
MFAP5	5' CCTAGCCTGGCTT TCTTGCTC 3' (SEQ ID NO:25)	5' TAATACGACTCACTATAGGGCCT AGCCTGGCTTTCTTGCTC 3' (SEQ ID NO:26)	5' CCATTGGGTCTCT GCAAATCC 3' (SEQ ID NO:27)

Tabla 9: Tamaños de transcripción esperados y factores de conversión

Transcripción	Tamaño de transcripción esperado (bases)	Peso molecular (Daltons)	Copias/ng
HAPLN1	917	$3,145 \times 10^5$ g/mol	$1,914 \times 10^9$ /ng
MFAP5	698	$2,394 \times 10^5$ g/mol	$2,515 \times 10^9$ /ng

Tabla 10: Respuesta del ensayo frente a la proporción molecular de los marcadores

Copias de HAPLN1	Copias de MFAP5	Proporción molecular exacta de HAPLN1:MFAP5	Respuesta del ensayo, HAPLN1:MFAP5
1×10^8	1×10^8	1	0,470
1×10^7	1×10^7	1	0,448
1×10^6	1×10^6	1	0,423
1×10^5	1×10^5	1	0,452
1×10^4	1×10^4	1	0,443
1×10^3	1×10^3	1	0,478
			Promedio = 0,452

Tabla 11: Proporción molecular exacta en varias respuestas del ensayo

Respuesta del ensayo, HAPLN1:MFAP5	Proporción molecular exacta de HAPLN1:MFAP5
500	1106
100	221.2
5	11,06
1	2,212
0,2	0,4425
0,01	0,02212
0,002	0,004425

5 Ejemplo 8: Análisis para la cuantificación absoluta de los marcadores condrocitarios y fibroblásticos

[0110] Se llevó a cabo un análisis de la expresión génica usando un método de cuantificación absoluta. En la tabla 12 se enumeran los cultivos celulares usados en este ejemplo. Los distintos cultivos celulares se aislaron y se cultivaron como se discute en los ejemplos anteriores. El ARN de los cultivos celulares se aisló usando el kit RNeasy como se discutió en el ejemplo 3. La RT-PCR se llevó a cabo en los cultivos celulares como se describió en el ejemplo 3, excepto porque se usaron 2 μ l de cDNA por cada 13 μ l de reacción PCR. Los estándares de ARN transcritos *in vitro* para HAPLN1 y MFAP5 (preparados como se describe en el ejemplo 7) se diluyeron para obtener cDNA a concentraciones finales de 5×10^2 , 5×10^3 , y 5×10^4 copias por μ l. Las curvas estándares se generaron realizando una gráfica con los resultados de Ct a partir de los estándares en el eje y, frente al logaritmo del número de copias por reacción (10^3 , 10^4 y 10^5) en el eje x. A los datos se ajustó una pendiente lineal, y la cantidad de copias de ARNm de HAPLN1 y MFAP5 presentes en cada muestra analizada se determinó matemáticamente. Este método de cuantificación fue descrito previamente, por ejemplo, en sistemas de PCR en tiempo real: Sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT y sistema de PCR en tiempo real 7300/7500 de Applied Biosystems, Guía química, Applied Biosystems, 2005, Parte N.º 4348358 Rev. E. A continuación se calculó la proporción molar de HAPLN1:MFAP5 para cada muestra. La figura 16 describe las proporciones molares de HAPLN1:MFAP5 en varios cultivos celulares. Estos resultados indican que la proporción molar de HAPLN1:MFAP5 en los condrocitos es elevada respecto a los sinoviocitos y los fibroblastos dérmicos.

Tabla 12: Cultivos celulares usados en el análisis de cuantificación absoluta (ejemplo 8)

Cultivo celular	Tipo de célula	Tipo de cultivo celular
C26	Condrocito	Segunda transferencia
C27	Condrocito	Segunda transferencia
C28	Condrocito	Segunda transferencia
S14	Sinoviocito	Tercera transferencia
S15	Sinoviocito	Tercera transferencia
S16	Sinoviocito	Tercera transferencia
F1	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia
F2	Fibroblasto dérmico	Segunda transferencia

LISTADO DE LA SECUENCIA

[0111]

<110> Genzyme Corporation

<120> MÉTODO DE EVALUACIÓN DE CÉLULAS Y ESTRUCTURAS CELULARES

5

<130> 07680.0060-00304

<150> US 60/910, 574<151>2007-04-06

<160> 27

<170> Patente en versión 3.5

<210> 1

10

<211> 2900

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 380 753 T3

at t ccagcct cat t gt aaca cacat t ct ac gcct agcct g gct t t ct t gc t ct ccct cat 60
 ct cat t gt t t cagcggaggc caaat ct gaa gt cct t t cca gggagt ggct ct gt t cat ct 120
 t at t cgccag ccaaagt agg aacagcgt aa gaggagagag acacat t cag cagccaaagg 180
 act cggg gga aagagcagaa cacat agac aat at gt cgc t ct t gggacc caaggt gct g 240
 ct gt t t ct t g ct gcat t cat cat cacct ct gact ggat ac ccct gggggg caat agt caa 300
 cgaggagacg at gt gact ca agcgact cca gaaacat t ca cagaagat cc t aat ct ggt g 360
 aat gat cccg ct acagat ga aacagt t t t g gct gt t t t gg ct gat at t gc acct t ccaca 420
 gat gact t gg cct ccct cag t gaaaaaat accact gcag agt gct ggga t gagaaat t t 480
 acct gcacaa ggct ct act c t gt gcat cgg ccggt t aaac aat gcat t ca t cagt t at gc 540
 t t caccagt t t acgacgt at gt acat cgt c aacaaggaga t ct gct ct cg t ct t gt ct gt 600
 aaggaacacg aagct at gaa agat gagct t t gccgt caga t ggct ggt ct gccccct agg 660
 agact ccgt c gct ccaat t a ct t ccgact t cct ccct gt g aaaal gt gga t t t gcagaga 720
 cccaat ggt c t gt gat cat t gaaaaagagg aaagaagaaa aaat gt at gg gt gagaggaa 780
 ggaggat ct c ct t ct t ct cc aaccat t gac agct aaccct t agacagt at t t ct t aaacc 840
 aat cct t t t g caat gt ccag ct t t t acccc t act ct ct ac t t t t t cacc aaact gat aa 900
 cat t t at ct c at t t t ct agc act t aaaa a caaagt ct at at t at t gcat aat t t t gct g 960
 ct t ct caat a t cat agacac agt gaat aga t gat gact at at ggct t at a t acaaacat t 1020
 ct at gt acaa t t t caagggg gact aaact t t aggct aat a at ct t t act a t t gaat ct gt 1080
 ct gat at aga t ct t aggggt t gaagaagct a t ct t t gt ct a t t t gggct aa ccat agaat t 1140
 t cat t t at t t t cct cacaat at t t t cct ag accaact ccc cat cat t cac gt gt t cct ct 1200
 t t act ct t ac t t t aact at t t t gct ggct t gcccgaaaat t t gcct ggca agt ct t cct t 1260
 at aagacaca t cat ggt aag t t t t gt agt c ct gt aagat t ct gcaacaca gt caagaat t 1320
 at acaat cct act agcaat a t at aaggacc caaaat gt ct t ct gct aagc t cagaggct g 1380
 gggct aaagc at gaggact a t gccagct at agaact t gga ct cat aat t c gct at ccaat 1440

ES 2 380 753 T3

t t t t cat gca gt t gt ct agt cg ggaagt aa ggt t ggaaac t aagt ct cat t t act gat t c 1500
 gt t t at ggg t agt accggga t gaaccacc accacaaagc aaat t agaca act t aat gt g 1560
 aaat cat acc at t ggt t gac gt t t cct t ga gt t gct act t cgt t cat ct t cacaact t aa 1620
 caagt gcacg gt cgaat t at t gt gcaagt g gct t t t ggat at cct gat t g gggcct aaga 1680
 agggcat t ca gact t gaat t t t aat aggca gacagaaagt t t gcct aat a gt t aat acga 1740
 aagagt gaaa gaaacacaat at t cagacaa cccacat t ct t at cct ggct ct agcagt aa 1800
 ccacgt agcc t t ggat aagc cat t t t cct t cat t aggt cc t ggt t t aat t t cct cat ct t 1860
 t aaaat gaga aggt t aat t t at ct t agt a ct gct gggcg cagt ggct ca t gcct gt aat 1920
 ct gagcact t t gggaaagct g aggcgggt gg at cact t gag gt cagaaat t t gagacgagc 1980
 ct ggccaaca t ggt gaaacc ccat ct ct ac t aaaaat aca aaaaat t agct gggcgt ggt g 2040
 gcacgt gcct gt aat cccag ct act cggga ggct gaggca ggagaat caa t t gaacct gg 2100
 gaggcagagg t t gcagt gag ccgagat ggc gccat t gcac t ccagcct gg gt gacaaaag 2160
 caaaagt cca t ct t aagaaa t at at at at a t at t at at at at t ct t agt t ct aagat t t c 2220
 ct t t aat t ct at gat t ct ct ggat t t aat gcat t at t ca t at t t ct t ga agct t agat a 2280
 cagt ct aat t cat agcaacc at at ct gct t t at cct aggt gagggt agca gt ccacaat g 2340
 gaat agaaga aaat cccat t at aacaaat g acaaat t at a t at cat gaat cct t ct gt ct 2400
 gact aact ca at aact t t ct at aaaagcca at ggaat t ca aat aggagct aggagacaac 2460
 aagt t at at a t gacagt gga ggt t gt at t c ct t t t at at t gct gagaaaa ct agt t aat 2520
 gat cagat t c t t gct gt t aa gaaacaat t t cgt t t aat gg gat ct gt aca act gat t t t a 2580
 aaaaaat gct acaaaaagcc ccaaagcat a t aat ct ct ac t cct t acagt ct ct agaat t 2640
 aaat gt act c at t t agacaa cat at t aat gcat at t t t a gccact t t ag agaaacct ca 2700
 t aggcacaga gt t t ccaaga t t aat t t t aa gaat at ct t c acgaact t ga ccct cct act 2760
 ccacat t gca acat t t ccat cagacagcat t t caat t cca gt at t at gt a t at t gcaaat 2820
 t aaacat t t t aaaaat at t t t t t t ccaat t t at t t ct caaa at aaaaat gt c t t t t gt t ct g 2880
 gt aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2900

<210> 2
 <211> 1759
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 380 753 T3

gt gaggagaa agagcgct ac gt t cact t ga t ct ccagct t ccaact t aag cagaact t ga 60
 gagcat ccga act cct ggat t t caggacaa gt gaagaaga t t ct t t gggc t at aaagat g 120
 aagagt ct ac t t ct t ct ggt gct gat t t ca at ct gct ggg ct gat cat ct t t cagacaac 180
 t at act ct gg at cat gacag agct at t cac at ccaagcag aaaat ggccc ccat ct act t 240
 gt ggaagcag agcaagccaa ggt gt t t t ca cacagaggt g gcaat gt t ac act gccat gt 300
 aaat t t t at c gagaccct ac agcat t t ggc t caggaat cc at aaaat ccg aat t aagt gg 360

 accaagct aa ct t cggat t a cct caaggaa gt ggat gt t t t t gt t t ccat gggat accac 420
 aaaaaaacct at ggaggct a ccagggt aga gt gt t t ct ga agggaggcag t gat agt gat 480
 gct t ct ct gg t cat cacaga cct cact ct g gaagat t at g ggagat at aa gt gt gaggt g 540
 at t gaaggat t agaagat ga t act gt t gt g gt agcact gg act t acaagg t gt ggt at t c 600
 cct t act t t c cagcact ggg gcgct acaat ct caat t t t c acgaggcgca gcaggcgt gt 660
 ct ggaccagg at gct gt gat cgct cct t c gaccagct gt acgacgcct g gcggggcggg 720
 ct ggact ggt gcaat gccgg ct ggct cagt gat ggct ct g t gcaat at cc cat cacaaag 780
 cccagagagc cct gt ggggg ccagaacaca gt gcccggag t caggaact a cggat t t t gg 840
 gat aaagat a aaagcagat a t gat gt t t t c t gt t t t acat ccaat t t caa t ggccgt t t t 900
 t act at ct ga t ccaccccac caaact gacc t at gat gaag cggg t gcaagc t t gt ct caat 960
 gat ggt gct c agat t gcaaa agt gggccag at at t t gct g cct ggaaaat t ct cggat at 1020
 gaccgct gt g at gcgggct g gt t ggcggat ggcagcgt cc gct accccat ct ct aggcca 1080
 agaaggcgt gcagt cct ac t gaggct gca gt gcgct t cg t ggggt t t ccc agat aaaaag 1140
 cat aagct gt at ggt gt ct a ct gct t caga gcat acaact gaat gt gccc t t agagcgca 1200
 t cagt t t t aa agt cat t aag aacat gt gaa aggt gt t t t t t t t t ccaat at gaact cat 1260
 gcaagt t acc aaaact gt ga t aaccct t t t t t act t act g t aaagagt ca t t t t cat aag 1320
 at caat t cat t gat t t gt t t t t t gt aaagc t at cat t caa t at at at t at aaat t aat at 1380
 aaat t t aagg gaagct ct at gt aaggagac t t agagccaa act gt t t aag ct gt at cat c 1440
 ccaacaaagt at cct t t cat gaacggggca t gcaat agct t aagaat t gc t aggat t aaa 1500
 t t aaggaaag t aaagct act cagagcaaca ggt t ccacaa gcacaaact t t acacat t t g 1560
 t acaat t t t g aaat gcact a caat aaacaa at t agagcaa cacat t t gaa at acaggct t 1620
 ct t t acat aa act gagaggi t at acaaaac t cagt t t cac aagggaaacaa t ct at acct t 1680
 t ct aaaagt t aat at t t caa gt ct ct aat a ggcagaat at t t t act ct t t aaaat cct gc 1740
 ct t t ct gacc aaaaaaaaaa 1759

<210> 3

<211> 661

<212> DNA

<213> Homo sapi ens

<400> 3

ES 2 380 753 T3

t ggt t ct t at aaaaacct ca cagcct t cca ct aacat ccc gt aggagcct ct ct ccct ac 60
t gct gct aca caagaccct g agact gacct gcaggacgaa accat gaaga gcct gat cct 120
t ct t gccat c ct ggccgcct t agcggg agt aact t t gt gt t at gaat cac at gaaagcat 180
ggaat ct t at gaact t aat c cct t cat t aa caggagaaat gcaaat acct t cat at cccc 240
t cagcagaga t ggagagct a aagt ccaaga gaggat ccga gaacgct ct a agcct gt cca 300
cgagct caat agggaagcct gt gat gact a cagact t t gc gaacgct acg ccat ggt t t a 360
t ggat acaat gct gcct at a at cgct act t caggaagcgc cgagggacca aat gagact g 420

aggaagaaa aaaaat ct ct t t t t t ct gg aggct ggcac ct gat t t t gt at ccccct gt 480
agcagcat t a ct gaaat aca t aggct t at a t acaat gct t ct t t cct gt a t at t ct ct t g 540
t ct ggct gca cccct t t t t c ccgccccag at t gat aagt aat gaaagt g cact gcagt g 600
agggt caaag gagagt caac at at gt gat t gt t ccat aat aaact t ct gg t gt gat act t 660
t 661

<210> 4 <211> 2974

<212> IADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 380 753 T3

agaagccccg cagccgccgc gcggagaaca gcgacagccg agcgccccgt ccgcct gt ct 60
 gccggt gggg ct gcct gccc gcgcagcaga cccggggcgg ccgcgggagc ccgcgccccg 120
 cccgccgcgc ct ct gccggg acccaccgc agcggagggc t gagccccgc ggcggct ccc 180
 cggagct cac ccacct ccgc gcgccggagc gcaggcaaaa ggggaggaaa ggct cct ct c 240
 t t t agt cacc act ct cgccc t ct ccaagaa t t t gt t t aac aaagcgct ga ggaaagagaa 300
 cgt ct t ct t g aat t ct t t ag t aggggcgga gt ct gct gct gccct gcgct gccacct cgg 360
 ct aact gcc ct ccgcgagc acccct gacc agccgggggt c acgt ccggga gacgggat ca 420
 t gaagcgct c ggt agccgt c t ggct ct t gg t cgggct cag cct cgggt gt c ccccagt t cg 480
 gcaaaggt ga t at t t gt gat cccaat ccat gt gaaaat gg aggt at ct gt t t gccaggat 540
 t ggct gat gg t t cct t t t cc t gt gagi gt c cagat ggct t cacagacccc aact gt t ct a 600
 gt gt t gt gga ggt t gcat ca gat gaagaag aaccaact t c agcaggt ccc t gact cct a 660
 at ccat gcca t aat ggagga acct gt gaaa t aagt gaagc at accgaggg gat acat t ca 720
 t aggct at gt t t gt aaat gt ccccgaggat t t aat gggat t cact gt cag cacaacat aa 780
 at gaat gcga agt t gagcct t gcaaaaaat g gt ggaat at g t acagat ct t gt t gct aact 840
 at t cct gt ga gt gccaggc gaat t t at gg gaagaaat t g t caat acaaa t gct caggcc 900
 cact gggaat t gaaggt gga at t at at caa accagcaaat cacagct t cc t ct act cacc 960
 gagct ct t t t t ggact ccaa aaat ggt at c cct act at gc acgt ct t aat aagaaggggc 1020
 t t at aaat gc gt ggacagct gcagaaaat g acagat ggcc gt ggat t cag at aaat t t gc 1080
 aaaggaaaat gagagt t act ggt gt gat t a cccaaggagc caagaggat t ggaagcccag 1140
 agt at at aaa at cct acaaa at t gcct aca gt aat gat gg aaagact t gg gcaat gt aca 1200
 aagt gaaagg caccaat gaa gacat ggt gt t t cgt ggaaa cat t gat aac aacact ccat 1260
 at gct aact c t t t cacaccc cccat aaaag ct cagt at gt aagact ct at ccccaagt t t 1320
 gt cgaagaca t t gact t t g cgaat ggaac t t ct t ggct g t gaact gt cg ggt t gt t ct g 1380
 agcct ct ggg t at gaaat ca ggacat at ac aagact at ca gat cact gcc t ccagcat ct 1440
 t cagaacgct caacat ggac at gt t cact t gggaaccaag gaaagct cgg ct ggacaagc 1500
 aaggcaaagt gaat gcct gg acct ct ggcc acaat gacca gt cacaat gg t t acaggt gg 1560

ES 2 380 753 T3

cct gagt ccc gggaggaaag t gct cgccca t t cct gacct gt gacacgct cact gcgaag 60
gcaggt t at t agaagagt cc cat gaaaggt ggct ccacgg t cccagcgac at gcaggggc 120
t cct ct t ct c cact ct t ct g ct t gct ggcc t ggcacagt t ct gct gcagg gt acagggca 180
ct ggaccat t agat acaaca cct gaaggaa ggctt ggaga agt gt cagat gcacct cagc 240
gt aaacagt t t t gt cact gg ccct gcaaat gccct cagca gaagccccgt t gccct cct g 300
gagt gagcct ggt gagagat ggct gt ggat gct gt aaaat ct gt gccaaag caaccagggg 360
aaat ct gcaa t gaagct gac ct ct gt gacc cacacaaagg gct gt at t gt gact act cag 420

t agacaggcc t aggt acgag act ggagt gt gt gcat acct t gt agct gt t ggggt gcgagt 480
t caaccaggt acat t at cat aat ggccaag t gt t t cagcc caaccct t g t t cagct gcc 540
t ct gt gt gag t ggggccat t ggat gcacac ct ct gt t cat accaaagct g gct ggcagt c 600
act gct ct gg agct aaaggt ggaaagaagt ct gat cagt c aaact gt agc ct ggaacat 660
t act acagca gct t t caaca agct acaaaa caat gccagc t t at agaaat ct cccact t a 720
t t t ggaaaaa aaaaat gt ct t gt gcaagcaa caaaat ggac t ccct gct cc agaacat gt g 780
ggat gggaat at ct aacagg gt gaccaat g aaaacagcaa ct gt gaaat g agaaaagaga 840
aaagact gt g t t acat t cag cct t gcgaca gcaat at at t aaagacaat a aagat t ccca 900
aaggaaaaac at gccaacct act t t ccaac t ct ccaaagc t gaaaaat t t gt ct t t t ct g 960
gat gct caag t act cagagt t acaaacca ct t t t t gt gg aat at gct t g gat aagagat 1020
gct gt at ccc t aat aagt ct aaaaat gat t a ct at t caat t t gat t gccca aat gaggggt 1080
cat t t aat g gaagat gct g t ggat t acat ct t gt gt gt g t cagagaaac t gcagagaac 1140
ct ggagat at at t t t ct gag ct caagat t c t gt aaaacca agcaaat ggg ggaaaagt t a 1200
gt caat cct g t cat at aat a aaaaaat t ag t gagt aaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1307

<210> 6
<211> 7137
<212> \overline{ADN}
<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 380 753 T3

cggccagg t gt gggact g aagt t ct t gg agaaggagt ccaact ct t c aaggt gaact 60
 at gaccact t t act ct ggg t t t t cgt gact ct gagggt ca t cact gcagc t gt cact gt a 120
 gaaact t cag accat gacaa ct cgct gagt gt cagcat cc cccaaccgt c cccgct gagg 180
 gt cct cct gg ggacct ccct cacat cccc t gct at t t ca t cgaccccat gcacct gt g 240
 accaccgccc ct t ct accgc cccact ggcc ccaagaat ca agt ggagccg t gt gt ccaag 300
 gagaaggagg t agt gct gct ggt ggccact gaagggcgcg t gcgggt caa cagt gcct at 360
 caggacaagg t ct cact gcc caact acccg gccat ccca gt gacgccac ct t ggaagt c 420
 cagagcct gc gct ccaat ga ct ct ggggt c t accgct gcg aggt gat gca t ggcat cgag 480
 gacagcgagg ccacct gga agt cgt ggt g aaaggcat cg t gt t ccat t a cagagccat c 540
 t ct acacgt acacct cga ct t t gacagg gcgcagcggg cct gcct gca gaacagt gcc 600
 at cat t gcc cgct gagca gct gcaggcc gcct acgaag acggct t cca ccagt gt gac 660
 gccggct ggc t ggct gacca gact gt caga t accccat cc aact ccccg ggaaggct gc 720
 t at ggagaca aggat gagt t t cct ggt gt g aggacgt at g gcat ccgaga caccaacgag 780
 acct at gat g t gt act gct t cgccgaggag at ggagggt g aggt ct t t t a t gcaacat ct 840
 ccagagaagt t cacct t cca ggaagcagcc aat gagt gcc ggcggct ggg t gcccgct g 900
 gccaccacgg gccacgt ct a cct ggct gg caggct ggca t ggacat gt g cagcgcggc 960

ES 2 380 753 T3

t ggct ggccg accgcagcgt gcgct acccc at ct ccaagg cccggcccaa ct gcggt ggc 1020
aacct cct gg gcgt gaggac cgt ct acgt g cat gcccaacc agacgggct a ccccgacccc 1080
t cat cccgct acgacgccat ct gct acaca ggt gaagact t t gt ggacat cccagaaaac 1140
t t ct t t ggag t ggggggt ga ggaggacat c accgt ccaga cagt gacct g gcct gacat g 1200
gagct gccac t gcct cgaaa cat cact gag ggt gaagccc gaggcagcgt gat cct t acc 1260
gt aaagccca t ct t cgaggt ct cccccagt cccct ggaac ccgaggagcc ct t cacgt t t 1320
gccct gaaa t aggggccac t gcct t cgct gaggt t gaga at gagact gg agaggccacc 1380
aggccct ggg gct t t cccac acct ggct g ggccct gcca cgcat t cac cagt gaggac 1440
ct cgt cgt gc aggt gaccgc t gt cct ggg cagccgcat t t gccaggggg ggt cgt ct t c 1500
cact accgcc cgggacccac ccgt act cg ct gacct t t g aggaggcaca gcaggcct gc 1560
cct ggcacgg gggcggf cat t gcct cgccg gagcagct cc aggccgcct a cgaagcaggc 1620
t at gagcagt gt gacgccgg ct ggct gggg gaccagaccg t cagat accc cat t gt gagg 1680
ccacggaccc cat gcgt ggg t gacaaggac agcagcccag gggf caggac ct at ggct g 1740
cgcccat caa cagagacct a cgat gt ct ac t gct t t gt ag acagact t ga gggggaggt g 1800
t t ct t cgcca cacgcct t ga gcagt t cacc t t ccaggaag cact ggagt t ct gt gaat ct 1860
cacaat gcca ct gccaccac gggccagct c t acgccgct ggagccgcgg cct ggacaag 1920
t gct at gccg gct ggct ggc cgacggcagc ct ccgt acc ccat cgt cac cccaaggcct 1980
gcct gcggt g gggacaagcc aggcgt gaga acggt ct acc t ct accct aa ccagacgggc 2040
ct cccagacc cact gt cccg gcacct gcc t t ct gct t cc gaggcatt t c agcggf t cct 2100
t ct ccaggag aagaagaggg t ggcacacc acat caccct ct ggt gt gga ggagt ggat c 2160
gt gacccaag t ggt t cct gg t gt ggct gct gt ccccgf ag aagaggagac aact gct gt a 2220
ccct cagggg agact act gc cat cct agag t t caccaccg agccagaaaa ccagacagaa 2280
t ggaaccag cct at acccc agt gggcaca t ccccgct gc cagggat cct t cct act t gg 2340
cct cct act g gcgccgaaac agaggaaagt acagaaggcc ct t ct gcaac t gaagt gcc 2400
t ct gcct cag aggaacct c cccct cagag gt gccat t cc cct cagagga gccat ccccc 2460
t cagaggaac cat t cccct c agt gaggcca t t cccct cag t ggagct gt t cccct cagag 2520
gagccat t cc cct ccaagga gccat ccccc t cagaggaac cat cagcct c agaagagccg 2580
t at acacct t cccccccga gccagct gg act gagct gc ccagct ct gg ggaggaat ct 2640
ggggcccct g at gt cagt gg t gact t caca ggcagt ggag at gt t t cagg acacct t gac 2700
t t cagt gggc agct gt cagg ggacagggca agt ggact gc cct ct ggaga cct ggact cc 2760
agt ggt ct t a ct t ccacagt gggct caggc ct gact gt gg aaagt ggact accct caggg 2820
gat gaagaga gaat t gagt g gccagcact cct acggt t g gt gaact gcc ct ct ggagct 2880
gagat cct ag agggct ct gc ct ct ggagt t ggggat ct ca gt ggact t cc t t ct ggagaa 2940
gt t ct agaga cct ct gcct c t ggagt agga gacct cagt g ggct t cct t c t ggagaagt t 3000
ct agagacca ct gccct gg agt agaggac at cagcgggc t t cct t ct gg agaagt t ct a 3060

ES 2 380 753 T3

gagaccact g cccct ggagt agaggacat c agcgggct t c ct t ct ggaga agt t ct agag 3120
accact gccc ct ggagt aga ggacat cagc gggct t cct t ct ggagaagt t ct agagacc 3180
act gcccct g gagt agagga cat cagcggg ct t cct t ct g gagaagt t ct agagaccact 3240
gcccct ggag t agaggacat cagcgggct t cct t ct ggag aagt t ct aga gaccgct gcc 3300
cct ggagt ag aggacat cag cgggct t cct t ct ggagaag t t ct agagac cgct gcccct 3360
ggagt agagg acat cagcgg gct t cct t ct ggagaagt t c t agagaccgc t gcccct gga 3420
gt agaggaca t cagcgggct t cct t ct gga gaagt t ct ag agaccgct gc ccct ggagt a 3480
gaggacat ca gcgggct t cc t t ct ggagaa gt t ct agaga ccgct gcccc t ggagt agag 3540
gacat cagcg ggct t cct t c t ggagaagt t ct agagaccg ct gcccct gg agt agaggac 3600
at cagcgggc t t cct t ct gg agaagt t ct a gagaccgct g cccct ggagt agaggacat c 3660
agcgggct t c ct t ct ggaga agt t ct agag act gct gccc ct ggagt aga ggacat cagc 3720
gggct t cct t ct ggagaagt t ct agagact gct gcccct g gagt agagga cat cagcggg 3780
ct t cct t ct g gagaagt t ct agagact gct gcccct ggag t agaggacat cagcgggct t 3840
cct t ct ggag aagt t ct aga gact gct gcc cct ggagt ag aggacat cag cgggct t cct 3900
t ct ggagaag t t ct agagac t act gcccct ggagt agagg agat cagcgg gct t cct t ct 3960
ggagaagt t c t agagact ac t gcccct gga gt agat gaga t cagt gggct t cct t ct gga 4020
gaagt t ct ag agact act gc ccct ggagt a gaggagat ca gcgggct t cc t t ct ggagaa 4080
gt t ct agaga ct t ct acct c t gcggg aggg gacct cagt g gact t cct t c t ggaggagaa 4140
gt t ct agaga t t t ct gt ct c t ggagt agag gacat cagt g ggct t cct t c t ggagaggt t 4200
gt agagact t ct gcct ct gg aat agaggat gt cagt gaac t t cct t cagg agaaggt ct a 4260
gagacct ct g ct t ct ggagt agaggacct c agcaggct cc ct t ct ggaga agaagt t ct a 4320
gagat t t ct g cct ct ggat t t ggggacct c agt ggagt t c ct t ct ggagg agaaggt ct a 4380
gagacct ct g ct t ct gaagt agggact gac ct cagt gggc t t cct t ct gg aaggagggt 4440
ct agagact t cagct t ct gg agct gaggac ct cagt gggg t gcct t ct gg aaaagaagac 4500
t t ggt ggggt cagct t ct gg agact t ggac t t gggcaaac t gcct t ct gg aact ct agga 4560
agt gggcaag ct ccagaaac aagt ggt ct t ccct ct ggat t t agt ggt ga gt at t ct ggg 4620
gt ggacct t g gaagt ggccc accct ct ggc ct gcct gact t t agt ggact t ccat ct gga 4680
t t cccaact g t t t ccct agt ggat t ct aca t t ggt ggaag t ggt cacagc ct cact gca 4740
agt gaact gg aaggaggggg aaccat t ggc at cagt ggt g caggagaaat at ct ggact g 4800
ccct ccagt g agct ggacat t agt gggaga gct agt ggac t ccct t cagg aact gaact c 4860
agt ggccaag cat ct gggg t t cct gat gt c agt ggggaaa t acct ggact ct t t ggt gt c 4920
agt ggacagc cat cagggt t t cct gacact agt ggggaaa cat ct ggagt gact gagct t 4980
agcgggct gt cct ct ggaca accaggt gt t agt ggagaag cat ct ggagt t ct t t at ggc 5040
act agt caac cct t t ggcat aact gat ct g agt ggagaaa cat ct ggggt ccct gat ct c 5100

ES 2 380 753 T3

agt gggcagc ct t caggg t accaggg t c agt ggggcaa cat caggagt ccct gacct g 5160
 gt t t ct ggt a ccacgagt gg cagcggg gaa t ct t ct ggg a t t acat t t gt ggacaccagt 5220
 t t ggt t gaag t ggcccct ac t acat t t aaa gaagaagaag gct t aggg t c t gt ggaact c 5280
 agt ggccct cc ct t ccggaga ggcagat ct g t caggcaaat ct gggat ggt ggat gt cagt 5340
 ggacagt t t t ct ggaacagt cgat t ccagt ggg t t t acat cccagact cc ggaat t cagt 5400
 ggccct accaa gt ggc at agc t gaggt cagt ggagaat cct ccagagct ga gat t gggagc 5460
 agcct gccct cgggagcat a t t at ggcagt ggaact ccat ct agt t t ccc cacgg t ct ct 5520
 ct t gt agaca gaact t t ggt ggaat ct gt a acccaggct c caacagccca agaggcagga 5580
 gaagggcct t ct ggc at t t t agaact cagt ggt gct cat t ct ggagcacc agacat gt ct 5640
 ggggagcat t ct ggat t t ct ggacct aagt gggct gcagt ccgggct gat agagcccagc 5700
 ggagagccac caggt act cc at at t t t agt ggggat t t t g ccagcaccac caat gt aagt 5760
 ggagaat cct ct gt agccat gggcaccagt ggagaggcct caggact t cc agaagt t act 5820
 t t aat cact t ct gagt t cgt ggagggt gt t act gaaccaa ct at t t ct ca ggaact aggc 5880
 caaaggcccc ct gt gacaca cacaccccag ct t t t t gagt ccagt ggaaa agt ct ccaca 5940
 gct ggggaca t t agt ggagc t accccagt g ct ccct ggg t ct ggagt aga agt at cat ca 6000
 gt cccagaat ct agcagt ga gacgt ccgcc t at cct gaag ct ggg t t cgg ggc at ct gcc 6060
 gccct gagg ccagcagaga agat t ct ggg t ccct gat c t gagt gaaac cacct ct gca 6120
 t t ccacgaag ct aacct t ga gagat cct ct ggcct aggag t gagcggcag cact t t gaca 6180
 t t t caagaag gcgaggcgt c cgct gcccc a gaagt gagi g gagaat ccac caccaccagt 6240
 gat gt gggga cagaggcacc aggct t gcct t cagccact c ccacggct t c t ggagacagg 6300
 act gaaat ca gcgagacct gt ct ggt cac acct cgcagc t gggcgt t gt cat cagcacc 6360
 agcat cccag agt ct gagt g gaccagcag acccagcgc ct gcagagac gcat ct agaa 6420
 at t gagt cct caagcct cct gt act cagga gaagagact c acacagt cga aacagccacc 6480
 t cccaacag at gct t ccat cccagct t ct ccggaat gga aacgt gaat c agaat caact 6540
 gct gcagacc aggaggt at g t gaggagggc t ggaacaagt accagggcca ct gt t accgc 6600
 cact t cccgg accgcgagac ct ggg t ggt gct gagcgc ggt gt cggga gcagcagt ca 6660
 cacct gagca gcat cgt cac ccccgaggag caggagt t t g t caacaacaa t gccaagac 6720
 t accagt gga t cggcct gaa cgacaggacc at cgaagggg act t ccgct g gt cagat gga 6780
 caccat gc aat t t gagaa ct ggcgcccc aaccagcct g acaact t t t t t gccgct gga 6840
 gaggact gt g t ggt gat gat ct ggcacgag aagggcgagt ggaat gat gt t ccct gcaat 6900
 t accacct cc cct t cagt g t aaaaagggc acagccacca cct acaaacg cagact acag 6960
 aagcggagct cacggcacc t cggaggagc cgccccagca cagcccact g agaagagct t 7020
 ccaggacgca cccaggacgc t gagcccagg agcct gccag gct gacgt gc at cccacca 7080
 gacgg t gt cc t ct t ct t gt c gct t t t t gt c at at aaggaa t cccat t aaa aaaaaa 7137

<210> 7
<211> 2471
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 380 753 T3

agaaagcgag cagccaccca gct ccccgcc accgccat gg t ccccgacac cgct gcgt t 60
 ct t ct gct ca ccct ggct gc cct cggcgcg t ccggacagg gccagagccc gt t gggct ca 120
 gacct gggcc cgcagat gct t cgggaact g caggaaacca acgcggcgct gcaggacgt g 180
 cgggagct gc t gcggcagca ggt cagggag at cacgt t cc t gaaaaacac ggt gat ggag 240
 t gt gacgcgt gcgggat gca gcagt cagt a cgcaccggcc t acccagcgt gcggcccct g 300
 ct ccaact gcg cgccccggct t ct gct t cccc ggcgt ggctt gcat ccagac ggagagcggc 360
 gcgcgct gcg gcccct gccc cgcgggct t c acgggcaacg gct cgcact g caccgacgt c 420
 aacgagt gca acgcccaccc ct gct t cccc cgagt ccgct gt at caacac cagcccgggg 480
 t t ccgct gcg aggct t gccc gccggggt ac agcggcccca cccaccaggg cgt ggggct g 540
 gct t t cgcca aggccaacaa gcaggt t t gc acggacat ca acgagt gt ga gaccgggcaa 600
 cat aact gcg t ccccaact c cgt gt gcat c aacaccggg gct cct t cca gt gcggcccg 660
 t gccagcccg gct t cgt ggg cgaccaggcg t ccggct gcc agcggcgcgc acagcgt t c 720
 t gccccgacg gct cgcccag cgagt gccac gagcat gcag act gcgt cct agagcgcgat 780
 ggct cgcggt cgt gcgt gt g t gccgt t ggc t gggccggca acgggat cct ct gt ggt cgc 840
 gacact gacc t agacggct t cccggacgag aagct gcgct gcccgagcg ccagt gccgt 900
 aaggacaact gcgt gact gt gccaact ca gggcaggagg at gt ggaccg cgat ggcat c 960
 ggagacgcct gcgat ccgga t gccgacggg gacggggt cc ccaat gaaaa ggacaact gc 1020
 ccgct ggt gc ggaaccaga ccagcgcaac acggacgagg acaagt gggg cgat gcgt gc 1080
 gacaact gcc ggt cccagaa gaacgacgac caaaaggaca cagaccagga cggccggggc 1140
 gat gcgt gcg acgacgacat cgacggcgac cggat ccgca accaggccga caact gccct 1200
 aggggt accca act cagacca gaaggacagt gat ggcgat g gt at agggga t gcct gt gac 1260
 aact gt cccc agaagagcaa cccggat cag gcggat gt gg accacgact t t gt gggagat 1320
 gct t gt gaca gcgat caaga ccaggat gga gacggacat c aggact ct cg ggacaact gt 1380
 cccacggt gc ct aacagt gc ccaggaggac t cagaccacg at ggccaggg t gat gcct gc 1440
 gacgacgacg acgacaat ga cggagt ccct gacagt cggg acaact gccg cct ggt gcct 1500
 aaccccggcc aggaggacgc ggacagggac ggcgt gggcg acgt gt gcca ggacgact t t 1560
 gat gcagaca aggt ggt aga caagat cgac gt gt gt ccgg agaacgct ga agt cacgct c 1620
 accgact t ca gggcct t cca gacagt cgt g ct ggaccggg aggggt gacgc gcagat t gac 1680
 cccaact ggg t ggt gct caa ccagggaagg gagat cgt gc agacaat gaa cagcgacca 1740
 ggctt ggct g t ggggt t acac t gcct t caat ggcgt ggact t cgagggcac gt t ccat gt g 1800
 aacacggt ca cggat gacga ct at gcgggc t t cat ct t t g gct accagga cagct ccagc 1860
 t t ct acgt gg t cat gt ggaa gcagat ggag caaacgt at t ggcaggcgaa cccct t ccgt 1920

ES 2 380 753 T3

gct gt ggccg agcct ggcat ccaact caag gct gt gaagt ct t ccacagg ccccggggaa 1980
cagct gcgga acgct ct gt g gcat acagga gacacagagt cccaggt gcg gct gct gt gg 2040
aaggaccgc gaaacgt ggg t t ggaaggac aagaagt cct at cgt t ggt t cct gcagcac 2100
cggccccaag t gggct acat cagggg gcga t t ct at gagg gccct gagct ggt ggccgac 2160
agcaacgt gg t ct t ggacac aacct gcgg ggt ggccgcc t ggggggt ct t ct gct t ct cc 2220
caggagaaca t cal ct gggc caacct gcgt t accgct gca at gacacat cccagaggac 2280
t at gagacc at cagct gcg gcaagcct ag ggaccaggt gaggaccgc cggat gacag 2340
ccacct cac cgcggct gga t gggggct ct gcaccagcc ccaaggggt g gccgt cct ga 2400
gggggaagt g agaaggct c agagaggaca aaat aaagt g t gt gt gcagg gaaaaaaaaa 2460
aaaaaaaaa a 2471

<210> 8

<211> 5087

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 380 753 T3

aacgggcgcc gcggcgggga gaagacgcag agcgct gct g ggct gccggg t ct cccgct t	60
ccccct cct g ct ccaagggc ct cct gcat g agggcgcggt agagaccgg acccgcgccg	120
t gct cct gcc gt t t cgct gc gct ccgcccg ggcccggct c agccaggccc cgcggt gagg	180
cat gat t cgc ct cggggct c cccagacgct ggt gct gct g acgct gct cg t cgccgct gt	240
cct t cgggt gt cagggccagg at gt ccagga ggct ggcagc t gt gt gcagg at gggcagag	300
gt at aat gat aaggat gt gt ggaagccgga gccct gccgg at ct gt gt ct gt gacact gg	360
gact gt cct c t gcgacgaca t aat ct gt ga agacgt gaaa gact gcct ca gccct gagat	420
cccc t cgga gagt gct gcc ccat ct gcc aact gacct c gccact gcca gt gggcaacc	480
aggaccaaag ggacagaaag gagaacct gg agacat caag gat at t gt ag gacccaaagg	540
acct cct ggg cct cagggac ct gcagggga acaaggacc agaggggat c gt ggt gacaa	600
agg t gaaaaa ggt gccct g gacct cgt gg cagagat gga gaacct ggga cccct ggaaa	660
t cct ggcccc cct ggt cct c ccggccccc t ggt cccct ggt ct t ggt g gaaact t t gc	720
t gccagat g gct ggaggat t t gat gaaaa ggct ggt ggc gccagt t gg gagt aat gca	780
aggaccaat g ggccccat gg gacct cgagg acct ccaggc cct gcagggt g ct cct gggcc	840
t caaggat t t caaggcaat c ct ggt gaacc t ggt gaacct ggt gt ct ct g gt cccat ggg	900
t cccgt ggt cct cct ggt c cccct ggaaa gcct ggt gat gat ggt gaag ct ggaaaacc	960
t ggaaaagct ggt gaaaggg gt ccgcct gg t cct caggggt gct cgt ggt t t cccaggaac	1020
cccaggcct t cct ggt gt ca aaggt cacag aggt t at cca ggct ggacg gt gct aaggg	1080
agaggcgggt gct cct ggt g t gaagggt ga gagt ggt t cc ccgggt gaga acggat ct cc	1140
gggccaat g ggt cct cgt g gcct gcct gg t gaaagagga cggact ggcc ct gct ggcgc	1200
t gcgggt gcc cgaggcaacg at ggt cagcc aggcccgca gggcct ccgg gt cct gt cgg	1260

ES 2 380 753 T3

t cct gct ggt ggt cct ggct t ccct ggt gc t cct ggagcc aagggt gaag ccggccccac 1320
t ggt gcccgt ggt cct gaag gt gct caagg t cct cgcggt gaacct ggt a ct cct ggggt c 1380
ccct gggcct gct ggt gcct ccggt aaccc t ggaacagat ggaat t cct g gagccaaagg 1440
at ct gct ggt gct cct ggca t t gct ggt gc t cct ggct t c cct gggccac ggggccct cc 1500
t ggcct caa ggt gcaact g gt cct ct ggg ccgaaaggt cagacgggt g aacct ggt at 1560
t gct ggct t c aaagggt gaac aaggcccaa gggagaacct ggccct gct g gccccaggg 1620
agcccct gga cccgct ggt g aagaaggcaa gagaggt gcc cgt ggagagc ct ggt ggcgt 1680
t gggcccat c ggt ccccct g gagaaagagg t gct cccggc aaccgcggt t t cccaggt ca 1740
agat ggt ct g gcaggt ccca agggagcccc t ggagagcga gggcccagt g gt ct t gct gg 1800
ccccaagga gccaacggt g acct ggccg t cct ggagaa cct ggcct t c ct ggagcccg 1860
gggt ct cact ggccgcct g gt gat gct gg t cct caaggc aaagt t ggcc ct t ct ggagc 1920
ccct ggt gaa gat ggt cgt c ct ggacct cc aggt cct cag ggggct cgt g ggcagcct gg 1980
t gt cat ggggt t t ccct ggcc ccaaagggt gc caacggt gag cct ggcaaag ct ggt gagaa 2040
gggact gcct ggt gct cct g gt ct gagggg t ct t cct ggc aaagat ggt g agacaggt gc 2100
t gcaggacct cct ggccct g ct ggacct gc t ggt gaacga ggcgagcagg gt gct cct gg 2160
gcat ct ggg t t ccagggac t t cct ggccc t cct ggt ccc ccaggt gaag gt ggaaaacc 2220
aggt gaccag ggt gt t cccg gt gaagct gg agcccct ggc ct cgt ggggt c ccaggggt ga 2280
acgaggt t t c ccaggt gaac gt ggct ct cc cgggt gccag ggcct ccagg gt ccccgt gg 2340
cct ccccggc act cct ggca ct gat ggt cc caaagggt gca t ct ggcccag caggcccccc 2400
t ggggct cag ggccct ccag gt ct t caggg aat gcct ggc gagaggggag cagct ggt at 2460
cgct gggccc aaaggcgaca ggggt gacgt t ggt gagaaa ggccct gagg gagcccct gg 2520
aaaggat ggt ggacgaggcc t gacaggt cc cat t ggcccc cct ggcccag ct ggt gct aa 2580
t ggcgagaag ggagaagt t g gacct cct gg t cct gcagga agt gct ggt g ct cgt ggcgc 2640
t ccgggt gaa cgt ggagaga ct gggcccc cggaccagcg ggat t t gct g ggcct cct gg 2700
t gct gat ggc cagcct gggg ccaagggt ga gcaaggagag gccggccaga aaggcgat gc 2760
t ggt gcccct ggt cct cagg gccct ct gg agcacct ggg cct cagggt c ct act ggagt 2820
gact ggt cct aaaggagccc gaggt gccca agggcccccg ggagccact g gat t ccct gg 2880
agct gct ggc cgcgt t ggac ccccaggct c caat ggcaac cct ggacccc ct ggt ccccc 2940
t ggt cct t ct ggaaaagat g gt cccaaagg t gct cgagga gacagcggcc ccct ggccg 3000
agct ggt gaa cccggcct cc aagggt cct gc t ggaccccc ggcgagaagg gagagcct gg 3060
agat gacggt ccct ct ggt g ccgaagggt cc accaggt ccc cagggt ct gg ct ggt cagag 3120
aggcat cgt c ggt ct gcct g ggcaacgt gg t gagagagga t t ccct ggct t gcct ggccc 3180
gt cgggt gag cccggcaagc aggggt gct cc t ggagcat ct ggagacagag gt cct cct gg 3240
ccccgt ggggt cct cct ggcc t gacgggt cc t gcaggt gaa cct ggacgag agggaagccc 3300

ES 2 380 753 T3

cggg gct gat ggccccct g gcagagat gg cgct gct gga gt caagggg g at cgt ggt ga 3360
 gact ggt gct gt gggagct c ct ggagcccc tgggccccct ggct cccct g gccccgct gg 3420
 t ccaact ggc aagcaaggag acagaggaga agct ggt gca caaggcccca tgggaccct c 3480
 aggaccagct ggagcccggg gaat ccaggg t cct caaggc cccagaggg g acaaaggaga 3540
 ggct ggagag cct ggcgaga gaggcct gaa gggacaccgt ggct t cact g gt ct gcaggg 3600
 t ct gccccg cct cct ggt c ct t ct ggaga ccaagggt gct t ct ggt cct g ct ggt cct t c 3660
 t ggccct aga ggt cct cct g gccccgt cgg t ccct ct ggc aaagat ggt g ct aat ggaat 3720
 ccct ggcccc at t gggcct c ct ggt ccccg t ggacgat ca ggcgaaaccg gccct gct gg 3780
 t cct cct gga aat cct ggac cccct ggt cc t ccagggt ccc cct ggccct g gcat cgacat 3840
 gt ccgct t t gct ggct t ag gcccggagaga gaagggcccc gacccccct gc agt acat gcg 3900
 ggccgaccag gcagccggg g gcct gagaca gcat gacgcc gaggt ggat g ccacact caa 3960
 gt ccct caac aaccagat t g agagcat ccg cagccccgag ggct cccgca agaaccct gc 4020
 t cgcacct gc agagacct ga aact ct gcca ccct gagt gg aagagt ggag act act ggat 4080
 t gaccccaac caaggct gca cct t ggacgc cat gaagggt t t t ct gcaaca t ggagact gg 4140
 cgagact t gc gt ct acccca at ccagcaaa cgt t cccaag aagaact ggt ggagcagcaa 4200
 gagcaaggag aagaaacaca t ct ggt t t gg agaaacct c aat ggt ggct t ccat t t cag 4260
 ct at ggagat gacaat ct gg ct cccaacac t gccaacgt c cagat gacct t cct acgct 4320
 gct gt ccacg gaaggct ccc agaacat cac ct accact gc aagaacagca t t gcct at ct 4380
 ggacgaagca gct ggcaacc t caagaaggc cct gct cat c cagggt cca at gacgt gga 4440
 gat ccgggca gagggcaat a gcagggt t cac gt acact gcc ct gaaggat g gct gcacgaa 4500
 acat accggt aagt ggggca agact gt t at cgagt accgg t cacagaaga cct cagcct 4560
 ccccat cat t gacat t gcac ccat ggacat aggagggccc gagcaggaat t cgggt gt gga 4620
 cat agggccg gt ct gct t ct t gt aaaaacc t gaaccaga aacaacacaa t ccgt t gcaa 4680
 acccaaagga cccaagt act t t ccaat ct c agt cact ct a ggact ct gca ct gaat ggct 4740
 gacct gacct gat gt ccat t cat cccacc t ct cacaggt t cggact t t t c t cccct ct ct 4800
 t t ct aagaga cct gaact gg gcagact gca aaat aaaat c t cgggt gt t ct at t t at t t at 4860
 t gt ct t cct g t aagacct t c ggggt caaggc agaggcagga aact aact gg t gt gagt caa 4920
 at gccccct g agt gact gcc cccagcccag gccagaagac ct ccct t cag gt gccgggcg 4980
 caggaact gt gt gt gt cct a cacaat ggt g ct at t ct gt g t caaacacct ct gt at t t t t 5040
 t aaaacat ca at t gat at t a aaaat gaaaa gat t at t gga aagt aca 5087

<210> 9

<211> 3704

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 380 753 T3

ccct caccgg gggcaggagg gaccaaggct gggcccagaa cacat agt cc t aggt aaca

60

ES 2 380 753 T3

gt gaaggggt cgt gagggga cagt gact cc ct t ccaaccc ct t ct t cat a gggact gt t g 120
 gcaaacaaag aaaat caact gggaaaat ga agacct gct g gaaaat t cca gt t t t ct t ct 180
 t t gt gt gcag t t t cct ggaa ccct gggcat ct gcagct gt caagcgt cgc cccagat t cc 240
 ct gt caat t c caat t ct aat ggt ggaaat g aact ct gt cc aaagat cagg at t ggccaag 300
 at gact t acc aggg t t gat ct gat ct ct c agt t ccaggt agat aaagca gcat ct agaa 360
 gagct at cca gagagt agt g ggat cagct a cat t gcaggt ggct t acaag t t gggaaat a 420
 at gt agact t caggat t cca act aggaat t t at at cccag t ggact gcct gaagaat act 480
 cct t ct t gac gacgt t t cga at gact ggaa gcact ct caa aaagaact gg aacat t t ggc 540
 agat t cagga t t cct ct ggg aaggagcaag t t ggcat aaa gat t aat ggc caaacacaat 600
 ct gt t gt at t t t cat acaag ggact ggat g gaagt ct cca aacagcagcc t t t t cgaat t 660
 t gt cct cct t gt t t gat t cc cagt ggcat a agat cat gat t ggcgt ggag aggagt agt g 720
 ct act ct t t t t gt t gact gc aacaggat t g aat ct t t acc t at aaagcca agaggcccaa 780
 t t gacat t ga t ggct t t gct gt gct gggaa aact t gcaga t aat cct caa gt t t ct gt t c 840
 cat t t gaact t caat ggat g ct gat ccat t gt gacccccct gcggcccagg agagaaact t 900
 gccat gagct gccagccaga at aacgcccga gccagaccac cgacgagaga ggt cccccgg 960
 gt gagcaggg t cct cccggg cct ccggggc cccct ggagt t ccaggcat c gat ggcat cg 1020
 acggg t gaccg aggt cct aag ggccccccgg gccccccggg t cct gcaggt gaaccgggaa 1080
 agccaggagc t ccaggcaag cct ggcacac ct ggcgct ga t ggat t aaca ggacct gat g 1140
 gat cccct gg ct ccat t ggg t caaaggac aaaaaggaga acct ggt gt g cct ggat cgc 1200
 gt ggat t t cc aggccgt ggt at t cct ggac cccct ggt cc t cct gggaca gcaggact cc 1260
 ct ggagagct t gggcgt gt a ggacct gt t g gt gaccct gg gagaagagga ccacct ggcc 1320
 cccct ggccc cccaggacc agaggaacaa t t ggct t t ca t gat ggagat ccat t gt gt c 1380
 ccaat gcct g t ccaccaggt cgct caggat at ccaggcct accaggcat g aggggt cat a 1440
 aaggggct aa aggagaaat t ggt gaaccag gaagacaagg acacaaggg t gaagaaggt g 1500
 accagggaga act cggagaa gt t ggagct c aaggacct cc aggagcccag ggt t t gcgag 1560
 gcat caccgg cat agt t ggg gacaaagggg aaaaaggt gc t cggggct t a gat ggt gaac 1620
 ct gggcct ca ggg t ct t cct ggt gcacct g gt gat caagg acagcgagga cct ccaggag 1680
 aagcaggt cc caaaggagat agaggggct g aagg t gct ag aggaat t cct ggt ct cct g 1740
 ggcccaaagg agacacgggt t t gccaggt g t ggat ggccg t gat gggat c cct ggaat gc 1800
 ct ggaacaaa ggg t gaacca ggaaaacct g ggct cct gg t gat gcagga t t gcaggggt 1860
 t accaggt gt acct ggaat t cct ggt gaa aggg t gt t gc t ggt gaaaag ggt agcacag 1920
 gt gct ccagg gaagcct ggt cagat gggaa at t caggcaa accgggcccag caggggct c 1980
 caggagaggt gggaccccga ggaccccagg ggct t cct gg cagt agagga gaat t aggac 2040
 cagt gggat c cccaggcct a ccaggt aac t ggg t ct ct ggg t agccct ggct cct g 2100
 gct t gcct gg gccccct gga ct t cct ggaa t gaaaggt ga caggggt gt a gt cgg t gaac 2160

ES 2 380 753 T3

cgggt ccaaa gggg gaacag ggt gcct ct g gt gaagaagg t gaagcagga gaaagggggg 2220
 aact tggaga t at aggat t a cct ggcccaa agggat ct gc aggt aat cct ggggaacct g 2280
 gct t gagagg gcct gagggg agt cgggggc t t cct ggagl ggaaggacca agaggaccac 2340
 ct ggaccccc gggg gt gcag ggagaacagg gt gccaccgg cct gcct ggt gt ccagggcc 2400
 ct ccgggt ag agcaccgaca gat cagcaca t t aagcaggt t t gcat gaga gt cat acaag 2460
 aacat t t t gc t gagat ggct gccagt ct t a agcgt ccaga ct caggt gcc act gggct t c 2520
 ct ggaaggcc t ggccct cct ggt cccccc gccct cct gg agagaat ggt t t cccaggcc 2580
 agat gggaat t cgt ggcct t ccgggcat t a aggggcccc t ggt gct ct t ggt t t gaggg 2640
 gacct aaagg t gact t ggga gaaaaggggg agcgt ggccc t ccaggaaga ggt cccaacg 2700
 gt t t gcct gg agct at aggt ct cccaggt g acccaggccc t gccagct at ggcagaaat g 2760
 gccgagacgg t gagcgaggc cccccagggg t ggcaggaat t cct ggagt g cct ggacccc 2820
 cgggacct cc t gggct t ccc ggt t t ct gt g agccagcct c ct gcacat g caggct ggt c 2880
 agcgagcat t t aacaaaggg cct gaccct t gaaaggct t a ct gct gcat g gct gt ct gca 2940
 t gaaccacgc ct ggt gaagg agcct gggg g agaaacacca t ccaaagct g gggcaaagat 3000
 gat t acct t c agcat gat t a caat gt at t a cct t cagt at gat t acagaa gt cct act t g 3060
 acaat cacat at agaagaac ggt gct at t c agt aagt t ct ct t t cct t t c cct t ggaggg 3120
 aagacagcag agt cat cagt t aaaaaaaaa aaaagaaaac caaacacct c cct t gaat aa 3180
 at t t at act c ct gt t cccag gat ct t gaggc t t t agt gt gc t at acct at g t gt ct t at cg 3240
 t gggccact g t gccaat aaa caaaaacaac t gt t t ggt t t acct cagt t g cagt agt t at 3300
 t t t cat t t ag aagt t gt t ct cagat t at t g t t t cagt t at at agaggat t act agact ag 3360
 t t at gaagaa accccact ac at t caat gga at t ggt gct t aaaat ct cat cgat gt gct g 3420
 t ct ct ggagt gat aagaaag ggct acat ct cccgaaat ga t t t ct t t acg t cat gt at t g 3480
 gt t t cct t ct t cacct t gaa ct t t t gt t ga act gt at gt a ct t t acccca aacct gt t aa 3540
 t at t t t gaggc gct t ct at gt gaaagcaaag aaat aat t t t aat act ct gg cat t cat aaa 3600
 t t t t at t gat gagat t at t t at t t t aaagg t t t gaggt aa cat ct ct ggt t gt accaaag 3660
 aagaaat aaa t at ggt t t ct t aat ct ct t g cat gt t t t ct t at a 3704

<210> 10

<211> 7291

<212> $\overline{\text{ADN}}$

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 380 753 T3

acacagt act ct cagct t gt t ggt ggaagc ccct cat ct g cct t cat t ct gaaggcaggg 60
cccggcagag gaaggat cag agggc cgcgg ccggagggt c ccggccggt g gggccaact c 120
agagggagag gaaagggt a gagacacgaa gaacgcaaac cat caaat tt agaagaaaa 180
gccct ttgac tttttcccc tctccctccc caatggctgt gt agcaaaca tccctggcga 240
tacctggaa aggacgaagt tggctcgcag tgcgaatttc_gtgggttgag ttcacagttg 300

ES 2 380 753 T3

t gagt gcggg gct cggagat ggagccgt gg t cct ct aggt ggaaaacgaa acggt ggct c	360
t gggat t t ca ccgt aacaac cct cgcatt g acct t cct ct t ccaagct ag agaggt caga	420
ggagct gct c cagt i gat gt act aaaagca ct agat t t t c acaat t ct cc agagggaaat a	480
t caaaaacaa cgggat t t t g cacaaacaga aagaat t ct a aaggct caga t act gct t ac	540
agagt t t caa agcaagcaca act cagt gcc ccaacaaaac agt t at t t cc aggt ggaact	600
t t cccagaag act t t t caat act at t t aca gt aaaaccaa aaaaaggaat t cagt ct t t c	660
ct t t t at ct a t at at aat ga gcat ggt at t cagcaaat t g gt gt t gaggt t gggagat ca	720
cct gt t t t t c t gt t t gaaga ccacact gga aaacct gcc cagaagact a t cccct ct t c	780
agaact gt t a acat cgct ga cgggaagt gg cat cgggt ag caat cagcgt ggagaagaaa	840
act gt gacaa t gat t gt t ga t t gt aagaag aaaaccacga aaccact t ga t agaagt gag	900
agagcaat t g t t gat accaa t ggaat cacg gt t t t t ggaa caaggat t t t ggat gaagaa	960
gt t t t t gagg gggacat t ca gcagt t t t t g at cacaggt g at cccaaggc agcat at gac	1020
t act gt gac at t at agt cc agact gt gac t ct t cagcac ccaaggct gc t caagct cag	1080
gaacct caga t agat gagt a t gcaccagag gat at aat cg aat at gact a t gagt at ggg	1140
gaagcagagt at aaagaggc t gaaagt gt a acagagggac ccaact gt aac t gaggagaca	1200
at agcacaga cggaggcaaa cat cgt t gat gat t t t caag aat acaact a t ggaacaat g	1260
gaaagt t acc agacagaagc t cct aggcat gt t t ct gggaa caaat gagcc aaat ccagt t	1320
gaagaaat at t t act gaaga at at ct aacg ggagaggat t at gat t ccca gaggaaaaat	1380
t ct gaggat a cact at at ga aaacaagaa at agacggca gggat t ct ga t ct t ct ggt a	1440
gat ggagat t t aggcgaat a t gat t t t t at gaat at aaag aat at gaaga t aaaccaaca	1500
agccccct a at gaagaat t t ggt ccaggt gt accagcag aaact gat at t acagaaaca	1560
agcat aaat g gccat ggt gc at at ggagag aaaggacaga aaggagaacc agcagt ggt t	1620
gagcct ggt a t gct t gt cga aggaccacca ggaccagcag gacct gcagg t at t at ggg	1680
cct ccaggt c t acaaggccc cact ggacc cct ggt gacc ct'ggcgat ag gggccccca	1740
ggacgt cct g gct t accagg ggct gat ggt ct acct ggt c ct cct ggt ac t at gt t gat g	1800
t t accgt t cc gt t at ggt gg t gat ggt t cc aaaggacca ccat ct ct gc t caggaagct	1860
caggct caag ct at t ct t ca gcaggct cgg at t gct ct ga gaggcccacc t ggcccaat g	1920
gggt ct aact g gaagaccagg t cct gt gggg gggcct ggt t cat ct ggggc caaaggt gag	1980
agt ggt gat c caggct cct ca gggccct cga ggcgt ccagg gt cccct gg t ccaacggga	2040
aaacct ggaa aaaggggt cg t ccaggt gca gat ggaggaa gaggaat gcc aggagaacct	2100
ggggcaaagg gagat cgagg gt t t gat gga ct t ccgggt c t gccaggt ga caaaggt cac	2160
aggggt gaac gaggt cct ca aggt cct cca ggt cct cct g gt gat gat gg aat gagggga	2220
gaagat ggag aaat t ggacc aagaggt ct t ccaggt gaag ct ggcccacg aggt t t gct g	2280
gggt ccaaggg gaact ccagg agct ccaggg cagcct ggt a t ggcaggt gt agat ggcccc	2340

ES 2 380 753 T3

ccaggacca aaggaacat gggccccaa ggggagcct g ggcct ccagg t caacaagg 2400
 aat ccaggac ct caggt ct t cct ggt cca caaggt cca t t ggt cct cc t ggt gaaaa 2460
 ggaccacaag gaaaaccagg act t gct gga ct t cct ggt g ct gat gggcc t cct ggt cat 2520
 cct gggaaag aaggccagt c t ggagaaaag ggggct ct gg gt cccct gg t ccacaaggt 2580
 cct at t ggt acccgggcc ccggggagt a aagggagcag at ggt gt cag aggt ct caag 2640
 ggat ct aaag gt gaaaagg t gaagat ggt t t t ccaggat t caaaggt ga cat ggt ct a 2700
 aaaggt gaca gaggagaagt t ggt caaat t ggccaagag gggaagat gg cct gaagga 2760
 cccaaaggt c gagcaggccc aact ggagac ccaggt cct t caggt caagc aggagaaaag 2820
 ggaaaact t g gagi t ccagg at t accagga t at ccaggaa gacaaggt cc aaaggt t cc 2880
 act ggat t cc ct ggt t t cc aggt gccaat ggagagaaaag gt gcacggg agt agct ggc 2940
 aaaccaggcc ct cgggt ca gcgt ggt cca acgggt cct c gaggt t caag aggt gcaaga 3000
 ggt cccact g gaaaacct gg gccaaagggc act t caggt g gcgat ggccc t cct ggcct 3060
 ccaggt gaaa gaggt cct ca aggacct cag ggt ccagt t g gat t cct gg accaaaaggc 3120
 cct cct ggac cacct gggaa ggal gggct g ccaggacacc ct gggcaacg t ggggagact 3180
 ggat t t caag gcaagaccgg cct cct ggg ccagggggag t ggt t ggacc acagggacca 3240
 accgt gaga ct ggt ccaat aggggaact gggcat cct g gccct cct gg cct cct ggt 3300
 gagcaaggt c t t cct ggt gc t gcaggaaa gaaggt gcaa aggt gat cc aggt cct caa 3360
 ggt at ct cag gaaaagat gg accagcagga t t acgt ggt t t cccagggga aagaggt ct t 3420
 cct ggagct c aggt gcacc t ggact gaaa ggaggggaag gt cccaggg cccaccaggt 3480
 ccagt t ggt caccaggaga acgt ggt ca gcaggt acag ct ggccaat t ggt t t acca 3540
 gggcgcccg gacct cagg t cct cct ggt ccagct ggag agaaaggt gc t cct ggagaa 3600
 aaaggt cccc aaggcct gc agggagagat ggagt t caag gt cct gt t gg t ct cccaggg 3660
 ccagct ggt c ct gccgct c cct gggaa gacggagaca aggt gaaat t ggt gagccg 3720
 ggacaaaag gcagcaagg t gacaagga gaaaat gcc ct cccgt cc cccaggt ct t 3780
 caaggaccag t t ggt gccc t ggaat t gct ggaggt gat g gt gaaccagg t cct agagga 3840
 cagcagggga t gt t t gggca aaaaggt gat gaggt gcca gaggt t ccc t ggacct cct 3900
 ggt ccaat ag gt ct t cagg t ct gccaggc ccacct ggt g aaaaaggt ga aat ggggat 3960
 gt t ggt ccca t gggccacc t ggt cct cca ggccaagag gccct caagg t ccaat gga 4020
 gct gat ggac cacaaggacc cccaggt ct gt t ggt t cag t t ggt ggt gt t ggagaaaag 4080
 ggt gaacct g gagaagcagg gaaccagg cct cct ggg aagcaggt gt aggcgt ccc 4140
 aaaggagaaa gaggagagaa aggggaagct ggt ccacct g gagct gct gg acct ccaggt 4200
 gccaagggc caccaggt ga t gal gccc t aagggt aacc cgggt cct gt t ggt t t t cct 4260
 ggagat cct g gt cct cct gg ggaacct ggc cct gcaggt c aagat ggt gt t ggt ggt gac 4320
 aagggt gaag at ggagat cc t ggt caacc ggt cct cct g gccat ct gg t gaggct ggc 4380
 ccaccaggt c ct cct ggaaa acgaggt cct cct ggagct g caggt gcaga gggaagacaa 4440

ES 2 380 753 T3

ggt gaaaaag gt gct aaggg ggaagcaggt gcagaaggt c ct cct ggaaa aaccggccca 4500
 gt cggt cct c agggacct gc aggaaagcct ggt ccagaag gt ct t cgggg cat ccct ggt 4560
 cct gt gggag aacaaggt ct ccct ggagct gcaggccaag at ggaccacc t ggt cct at g 4620
 ggacct cct g gct t acct gg t ct caaaggt gacct ggct ccaaggg ga aaaggacat 4680
 cct ggt t t aa t t ggct gat t ggt cct cca ggagaacaag gggaaaaagg t gaccgagg 4740
 ct ccct ggaa ct caaggat c t ccaggagca aaaggggat g ggggaat t cc t ggt cct gct 4800
 ggt ccct t ag gt ccacct gg t cct ccaggt t t accaggt c ct caaggccc aaagggt aac 4860
 aaaggct ct a ct ggaccgc t ggccagaaa ggt gacagt g gt ct t ccagg gcct cct ggg 4920
 t ct ccaggt c cacct ggt ga agt cat t cag cct t t accaa t ct t gt cct c caaaaaacg 4980
 agaagacat a ct gaaggcat gcaagcagat gcagat gat a at at t ct t ga t t act cggat 5040
 ggaat ggaag aaat at t t gg t t ccct caat t ccct gaaac aagacat t ga gcat at gaaa 5100
 t t t ccaat gg gt act cagac caat ccagcc cgaact t gt a aagacct gca act cagccat 5160
 cct gact t cc cagat ggt ga at at t ggat t gat cct aacc aaggt t gct c aggagat t cc 5220
 t t caaagt t t act gt aat t t cacat ct ggt ggt gagact t gcat t t at cc agacaaaaa 5280
 t ct gagggag t aagaat t t c at cat ggcca aaggagaac caggaagt t g gt t t agt gaa 5340
 t t t aagaggg gaaaact gct t t cat act t a gat gt t gaag gaaat t ccat caat at ggt g 5400
 caaat gacat t cct gaaact t ct gact gcc t ct gct cggc aaaat t t cac ct accact gt 5460
 cat cagt cag cagcct ggt a t gat gt gt ca t caggaagt t at gacaaagc act t cgct t c 5520
 ct gggat caa at gat gagga gat gt cct at gacaat aat c ct t t t at caa aacact gt at 5580
 gat ggt t gt g cgt ccagaaa aggct at gaa aagact gt ca t t gaaat caa t acacaaaaa 5640
 at t gat caag t acct at t gt t gat gt cat g at caat gact t t ggt gat ca gaat cagaag 5700
 t t cggt t t g aagt t ggt cc t gt t t gt t t t ct t ggct aag at t aagacaa agaacat at c 5760
 aaat caacag aaaat at acc t t ggt gccac caacccat t t t gt gccacat gcaagt t t t g 5820
 aat aaggat g gt at agaaaa caacgct gca t at acaggt a ccat t t agga aat accgat g 5880
 cct t t gt ggg ggcaaat ca cat ggcaaaa gct t t gaaaa t cat aaagat at aagt t ggt 5940
 gt ggct aaga t ggaaacagg gct gat t ct t gat t ccaat t ct caact ct cct t t t cct a 6000
 t t t gaat t t c t t t ggt gct g t agaaaacaa aaaaagaaaa at at at at t c at aaaaaat a 6060
 t ggt gct cat t ct cat ccat ccaggat gt a ct aaaacagt gt gt t t aat a aat t gt aat t 6120
 at t t t gt gt a cagt t ct at a ct gt t at ct g t gt ccat t t c caaaact t gc acgt gt ccct 6180
 gaat t ccat c t gact ct aat t t t at gagaa t t gcagaact ct gat ggcaa t aat at at g 6240
 t at t at gaaa aaat aaagt t gt aat t t ct g at gact ct aa gt ccct t t ct t t ggt t aat a 6300
 at aaaaat gcc t t t gt at at a t t gat gt t ga agagt t caat t at t t gat gt cgccaacaaa 6360
 at t ct cagag ggcaaaaat c t ggaagact t t t ggaagcac act ct gat ca act ct t ct ct 6420
 gccgacagt c at t t t gct ga at t t cagcca aaaat at t at gcat t t t gat gct t t at t ca 6480

ES 2 380 753 T3

aggct at acc t caaact t t t t c t t c t caga at ccaggat t t cacaggat a ct t gt at at a 6540
t ggaaaacaa gcaagt t t at at t t t t ggac agggaaat gt gt gt aagaaa gt at at t aac 6600
aaat caat gc ct ccgt caag caaacaat ca t at gt at act t t t t t t ct ac gt t at ct cat 6660
ct cct t g t t t t cagt gt gct t caat aat gc aggt t aat at t aaagat gga aat t aagcaa 6720
t t at t t at ga at t t gt gcaa t gt t agat t t t c t t at caat caagt t c t t g aat t t gat t c 6780
t aagt t gcat at t at aacag t ct cgaaaaat t at t t t act t gcccaacaaa t at t act t t t 6840
t t cct t t caa gat aat t t t a t aaat cat t t gacct acct a at t gct aaat gaat aacat a 6900
t ggt ggact g t t at t aagag t at t t g t t t aagt cat t ca ggaaaat ct a aact t t t t t 6960
t ccact aagg t at t t act t t aaggt agct t gaaat agcaa t acaat t t aa aaat t aaaaa 7020
ct gaat t t t g t at ct at t t t aagt aat at a t gt aagact t gaaaat aat gt t t t at t t c 7080
t t at at aaag t g t t aaat t a at t gat acca gat t t cact g gaacagt t t c aact gat aat 7140
t t at gacaaa agaacat acc t gt aat at t g aaat t aaaaa gt gaaat t t g t cat aaagaa 7200
t t t c t t t at t t t t gaaat c gagt t t gt aa at gt cct t t t aagaagggag at at gaat cc 7260
aat aaat aaa ct caagt ct t ggct acct gg a 7291

<210> 11
<211> 1538
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 380 753 T3

ccgt gcaccg t gt gt gcgcg cggcgt t gaa at gccct gca cgt cggggca gcgggacaga 60
 t cccagggg t cccagggagt ct ccaagt gc ct cact cct c ccgccgcaa cat gacagag 120
 aact ccgaca aagt t cccat t gccct ggt g ggacct gat g acgt ggaat t ct gcagcccc 180
 ccggcgt acg ct acgct gac ggt gaagccc t ccagccccg cgcggct gct caaggt ggga 240
 gccgt ggt cc t cat t t cggg agct gt gct g ct gct ct t t g gggccat cgg ggcct t ct ac 300
 t t ct ggaagg ggagcgacag t cacat t t ac aat gt ccat t acaccat gag t at caat ggg 360
 aaat t acaag at gggg caat ggaaat agac gct gggaaca act t ggagac ct t t aaaat g 420
 ggaagt ggag ct gaagaagc aat t gcagt t aat gat t t cc agaat ggcat cacaggaat t 480
 cgt t t t gct g gaggagagaa gt gct acat t aaagcgcaag t gaaggct cg t at t cct gag 540
 gt gggcgccg t gaccaaca gagcat ct cc t ccaaact gg aaggcaagat cat gccagt c 600
 aaat at gaag aaaat t ct ct t at ct gggg t gct gt agat c agcct gt gaa ggacaacagc 660
 t t ct t gagt t ct aaggt gt t agaact ct gc ggt gacct t c ct at t t t ct g gct t aaacca 720
 acct at ccaa aagaaat cca gagggaaaga agagaagt gg t aagaaaaat t gt t ccaact 780
 accacaaaaa gaccacacag t ggaccacgg agcaaccag gcgct ggaag act gaat aat 840
 gaaaccagac ccagt gt t ca agaggact ca caagcct t ca at cct gat aa t cct t at cat 900
 cagcaggaag gggaaagcat gacat t cgac cct agact gg at cacgaagg aat ct gt t gt 960
 at agaat gt a ggcggagct a caccact gc cagaagat ct gt gaaccct ggggggct at 1020

 t acccat ggc ct t at aat t a t caaggct gc cgt t cggcct gcagagt cat cat gccat gt 1080
 agct ggt ggg t ggcccgt at ct t gggcat g gt gt gaaat c act t cat at a t cat gt gct g 1140
 t aaaat aaga act agct gaa gagacaacca aagaagcat t aaggcagg t gat gct gat g 1200
 ggacat aaa at at t t t t ac act caacct g agcgg t at t ct t gacact c t t aacagaat 1260
 t t t t t caat t gt t t t ccaga act t t agt at at gcaaat gt act gaaaggg t agt t caagt 1320
 ct aaaat gcc at aaccct t t at t at t t gt t at t t t t at t t gcat t gct t t gccat aag 1380
 t ct t ccct t g ct t gt at ct t ccaaagct at t t t gaaat aa acat gaaaat t t acagt t t g 1440
 ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1538

<210> 12
 <211> 1135
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 12

ES 2 380 753 T3

gggcagaggg aat aagaggc tgcct ct gcc caccagt cct gccgcccagg acccgcagca 60
 gagacgacgc ctgcagcaag gagaccagga aggggt gaga caaggaagag gat gt ct gag 120
 ctggagaagg ccat ggt ggc cct cat cgac gt t t t ccacc aat at t ct gg aaggaggga 180
 gacaagcaca agct gaagaa at ccgaact g aaggagct ca t caacaat ga gct t t cccat 240
 t t ct t agagg aaat caaaga gcaggaggt t gt ggacaaag t cat ggaaac act ggacaat 300
 gat ggagacg gcgaat gt ga ct t ccaggaa t t cat gccct t t gt t gccat ggt t act act 360
 gcct gccacg agt t ct t t ga acat gagt ga gat t agaaag cagccaaacc t t t cct gt aa 420
 cagagacggt cat gcaagaa agcagacagc aagggt t gc agcct agt ag gagct gagct 480
 t t ccagccgt gt t gt agct a at t aggaagc t t gat t t gct t t gt gat t ga aaaat t gaaa 540
 acct ct t t cc aaaggct gt t t t aacggcct gcat cat t ct t t ct gct at a t t aggcct gt 600
 gt gt aagct g act ggcccca gggact ct t g t t aacagt aa ct t aggagt c aggt ct cagt 660
 gat aaagcgt gcaccgt gca gcccgccat g gccgt gt aga ccct aaccg gagggaaacc 720
 t gact acaga aat t accccg gggcaccct t aaaact t cca ct acct t t aa aaaacaaagc 780
 ct t at ccagc at t at t t gaa aacact gct g t t ct t t aat gcgt t cct ca t ccat gcaga 840
 t aacagct gg t t ggccggt g t ggccct gca agggcgt ggt ggct t cggcc t gct t cccgg 900
 gat ggcct g at caccaggt gaacgct cag cgct ggcagc gct cct ggaa aaagcaact c 960
 cat cagaact cgcaat ccga gccagct ct g ggggct ccag cgt ggct cc gt gacctat g 1020
 cgat t caagt cgcggt gca ggat cct t gc ct ccaact g cct ccagcac at gcggct t c 1080
 cgagggcact accgggggct ct gagccacc gcgagggcct gcgt t caat a aaaag 1135

<210> 13
 <211> 2889
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 380 753 T3

ct ggct gccg gct gct gcca ccgcaat ccc ggct cct aaa t cagcgcggg gaggcgct cc 60
 ct cccacgc ccggct ct cc gggct ct cgg ggccgcgat t ggccgcgccg gcgccccca 120
 ccccgggccc ccggct ccag ct gccgcgcc at t ggct gcg ggct ccgcc agcct t t aca 180
 t aagaccggg cgcgct cgag t ggagt t gt a t aaagcgagc gcgcggcgt c ggggcgggag 240
 gct cgaggcc agcccgggac cggggct ggg agcaagcagg cggcggcgcc ggcggcagag 300
 gcggcagcga gcgcccgt t cccacgcccc t aggcggcgg ggccgagagc gggaggat gg 360
 ct ccgagcgc t gacccggc at gt ccagga t gt t accgt t cct gct gct g ct ct ggt t t c 420
 t gcccat cac t gagggt cc cagcgggct g aacccat gt t cact gcagt c accaact cag 480
 t t ct gcct cc t gact at gac agt aat ccca cccagct caa ct at ggt gt g gcagt t act g 540
 at gt ggacca t gat ggggac t t t gagat cg t cgt ggcggg gt acaat gga cccaacct gg 600
 t t ct gaagt a t gaccgggcc cagaagcggc t ggt gaacat cgcggt cgat gagcgcagct 660
 caccct act a cgcgt cggg gaccggcagg ggaacgccat cggggt caca gcct gcgaca 720
 t cgacgggga cggccgggag gagat ct act t cct caacac caat aat gcc t t ct cggggg 780
 t ggccacgt a caccgacaag t t gt t caagt t ccgcaat aa ccggt gggaa gacat cct ga 840
 gcgat gaggt caacgt ggcc cgt ggt gt gg ccagcct ct t t gccggacgc t ct gt gcct 900
 gt gt ggacag aaagggt ct ggacgt act ct at ct acat t gccaat t ac gcct acggt a 960
 at gt gggccc t gat gccct c at t gaaat gg accct gaggc cagt gacct c t cccggggca 1020
 t t ct ggcgt cagagat gt g gct gct gagg ct ggggt cag caaat at aca gggggccgag 1080
 gcgt cagcgt gggcccat c ct cagcagca gt gcct cgga t at ct t ct gc gacaat gaga 1140
 at gggcct aa ct t cct t t t c cacaaccggg gcgat ggcac ct t t gt ggac gct gcggcca 1200
 gt gct ggt gt ggacgacccc caccagcat g ggcgaggt gt cgccct ggct gact t caacc 1260
 gt gat ggcaa agt ggacat c gt ct at ggca act ggaat gg ccccccaccgc ct ct at ct gc 1320
 aat gagcac ccat ggggag gt ccgct t cc gggacat cgc ct cacccaag t t ct ccat gc 1380
 cct cccct gt ccgcacggt c at caccgccg act t t gaaa t gaccaggag ct ggagat ct 1440
 t ct t caaca cat t gcct ac cgcagct cct cagccaaccg cct ct t ccgc gt cat ccgt a 1500
 gagagcacgg agacccct c at cgaggagc t caat cccgg cgacgcct t g gacct gagg 1560
 gccggggcac aggggt gt g gt gaccgact t cgacggaga cgggat gct g gacct cat ct 1620
 t gt cccat gg agagt ccat g gct cagccgc t gt ccgt ct t ccggggcaat cagggt t ca 1680
 acaacaact g gct gcgagt g gt gccacgca cccggt t t gg ggct t t gcc aggggagct a 1740
 aggt cgt gct ct acaccaag aagagt gggg cccacct gag gat cat cgac gggggt cag 1800
 gct acct gt g t gagat ggag cccgt ggcac act t t ggct ggggaaggat gaagccagca 1860
 gt gt ggaggt gacgt ggcca gat ggcaaga t ggt gagccg gaacgt ggcc agcggggaga 1920
 t gaact cagt gct ggagat c ct ct accccc gggat gagga cacact t cag gaccagccc 1980
 cact ggagt g t ggccaagga t t ct cccagc aggaaaat gg ccat t gcat g gacaccaat g 2040

ES 2 380 753 T3

aat gcat cca gt t cccat t c gt gt gccct c gagacaagcc cgt at gt gt c aacacct at g	2100
gaagct acag gt gccggacc aacaagaagt gcagt cgggg ct acgagccc aacgaggat g	2160
gcacagcct g cgt ggggact ct cggccagt caccggggccc ccgccccacc acccccaccg	2220
ct gct gct gc cact gccgct gct gct gccg ct gct ggagc t gccact gct gcaccggt cc	2280
t cgt agat gg agat ct caat ct ggggt cgg t ggt t aagga gagct gcgag cccagct gct	2340
gagcaggggt gggacat gaa ccagcggat g gagt ccagca ggggagt ggg aaagt gggct	2400
t gt gct gct g cct agacagt agggat gt aa aggcct gggg gct agaccct cccaagccc	2460
at ccat gcac at t act t agc t aacaat t ag ggagact cgt aaggccaggc cct gt gct gg	2520
gcacat agct gt gat cacag cagacagggt cgct gccct g at ggcgct t a cat t ccagt g	2580
ggi ct aat ga ccat at ct t a ggacacagat gt gcccaggg aggt ggt gt c act gcacagg	2640
aagt at gagg act t t agt gt cct gagt t ca aat cct gat t caggaact ca caaagct at g	2700
t gacct t aca ccagt cact t aact t gt t ag ccat ccat t a t cgcct ct gc aaaat gggga	2760
t t aagaat ag aat ct t gggg t t agt gt gga gat t agat t a aat gt at gt a agacact t gg	2820
cacaaaacct ggcacat agt aaaggct caa t aaaaacaag t gcct ct cac t gggct t t gt	2880
caacacgt g	2889

<210> 14

<211> 3935

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 380 753 T3

ggagagccga aagcggagct cgaaact gac tggaaacttc agtggcgcgg agactcgcca 60
 gt t t caacc cggaact t t t c t t t gcagg aggagaagag aaggggt gca agcgccccca 120
 c t t t t gct ct t t t t cct ccc ct cct cct cc t ct ccaat t c gcct ccccc act t ggagcg 180
 ggcagct gt g aact ggccac cccgcgcct t cct aagt gct cgccgcggt a gccggccgac 240
 gcgccagct t ccccgaggc cgct t gct cc gcat ccgggc agccgagggg agaggagccc 300
 gcgcct cgag t ccccgagcc gccgcggct t ct cgct t t c ccggccacca gccccct gcc 360
 ccgggcccgc gt at gaat ct cct ggacccc t t cat gaaga t gaccgacga gcaggagaag 420
 ggct gt ccg gcgccccag cccaccat g t ccgaggact ccgcgggct c gccct gcccg 480
 t cgggct ccg gct cggacac cgagaacacg cggccccagg agaacacgt t ccccaagggc 540
 gagcccgat c t gaagaagga gagcgaggag gacaagt t cc ccgt gt gcat ccgcgaggcg 600
 gt cagccagg t gct caaagg ct acgact gg acgct ggt gc ccat gccggt gcgcgt caac 660
 ggct ccagca agaacaagcc gcacgt caag cggcccat ga acgcct t cat ggt gt gggcg 720
 caggcggcgc gcaggaagct cgcgaccag t acccgact t gcacaacgc cgagct cagc 780
 aagacgt gg gcaagct ct g gagact t ct g aacgagagcg agaagcggcc ct t cgt ggag 840
 gaggcggagc ggct gcgcgt gcagcacaag aaggaccacc cggat t acaa gt accagccg 900
 cggcgggagga agt cgg t gaa gaacgggcag gcggaggcag aggaggccac ggagcagacg 960

ES 2 380 753 T3

aaaaaattct tttttttttt tttttccaat tttaccttct ttaaaatagg ttgttggagc 3120
 tttcctcaaa gggfatggtc atctgttgtt aaattatgtt cttaactgta accagttttt 3180
 ttttatttat ctctttaatc tttttttatt attaaaagca agtttctttg tttcctcac 3240
 cctagatttg tataaatgcc tttttgtcca tccctttttt ctttgttgtt tttgttgaaa 3300
 acaactgga aacttgtttc tttttttgta taaatgagag attgcaaatg tagtgtatca 3360
 ctgagtcatt tgcagtggtt tctgccacag acctttgggc tgccttatat tgtgtgtgtg 3420
 tgtgggtgtg tgtgtgtttt gacacaaaaa caatgcaagc atgtgtcatc catatttctc 3480
 tacaacttct ctggagtgga gggaggctac ctggagggga tcagcccact gacagacctt 3540
 aatcttaatt actgctgtgg ctagagagtt tgaggatggc tttttaaaaa agacagcaaa 3600
 cttttttttt tatttaaaaa aagatatatt aacagtttta gaagtcagta gaataaatc 3660
 ttaaagcact caataatagg catccttcaa tttctgtata aaagcagatc tttttaaaaa 3720
 gatacttctg taacttaaga aacctggcat ttaaatcata ttttgtcttt aggtaaaagc 3780
 tttggtttgt gttcgtgttt tgtttgtttc acttgtttcc ctcccagccc caaacctttt 3840
 gttctctccg tgaacttac ctttcccttt tttcttctct tttttttttt tgtatattat 3900
 tgtttacaat aaatatacat tgcattaaaa agaaa 3935

- <210> 15
- <211> 8034
- <212> \overline{ADN}
- <213> Homo sapiens

- <400> 15

ES 2 380 753 T3

ct t g a g t g t t a g a g c t g a g t a g t t t t c c c a g a a t c t c t a a g t c c t t t t t a t g c t c t t t a	60
t g a a t g a a t a g a a t a g t a a a a g a t a a a t a a a t t t t t t c t t t t g g a t t t c t t a a c c a g t g	120
g a a a a a a t g t t g a c t t t a a a a g t t c a t a a a a t c a a a t t t t g c t t a a g a a t a t g t t a t t t c	180
c a c t t g t g a g g c c a g c c t g g t a g a c c t c t g g g a t c c t t t t c t g t t c a c t c a c a c a c c a c t	240
g a g a t a a g g a g t g a a g t g t g g g c t a a a t a g g g c t g a g g c t t g g g c a a g g g c a t t t c t g c c	300
a g a g c a c c a g a g a c g t c a g c a t c t c a a g g g c a c t g t g g t a t g g a a a g g a c g c c a c a t g a	360
g t a a a t t t t a a a a a t a a a t a t t t t t a a a g g t a a a a t g a g g t c c c t g t a t t t g a g g a	420
t a t a a a a g a t g a a a c t g a a g a a g a a a a g a t a g g g g a a g a a g a a a t g a a g a a g a a g a c c a g g t	480
c t t c t a t a a g c c t g t t a t t g a a g a c t t a a g c a t g g a a t t g g c c a g a a a a t g c a c g g a a c t	540
c a t t a g c g a t a t c c g t t a t a a a g a a g a g t t t a a a a a g t c c a a g g a t a a g t g t a c a t t t g t	600
g a c t g a c a g t c c t a t g c t a a a c c a t g t a a a a a t a t c g g t g c t t t t a t t t c t g a g g c a a a	660
a t a c a a a g g c a c c a t t a a a g c t g a c c t t t c t a a t t c t c t t t a t a a g c g g a t g c c a g c c a c	720
a a t t g a c a g t g t t t t t g c a g g a g a a g t t a c a c a g c t c c a g a g t g a g g t g g c c t a c a a g c a	780
g a a a c a t g a t g c t g c c a a a g g a t t c t c a g a t t a t g c c c a c a t g a a g g a g c c c c t g a g g t	840
t a a a c a t g c c a t g g a g g t c a a t a a a c a c c a g a g t a a t a t t t c t t a t a g g a a a g a c g t g c a	900
g g a c a c c c a c a c g t a c a g t g c a g a a c t t g a c c g a c c a g a c a t c a a g a t g g c a a c c c a g a t	960

ES 2 380 753 T3

ct ct aagat c at aagcaat g cagaat acaa gaaaggacaa ggaat aat ga at aaagagcc 1020
 cgct gt aat t ggaagaccag at t t t gaaca t gccgt ggaa gct t ct aaac t t t ct agt ca 1080
 aat t aat ac aaagaaaaat t cgat aat ga aat gaaggat aagaaacat c at t acaat cc 1140
 t ct t gaaagt gct t ct t t t a ggcagaat ca gct t gct gct acact ggcga gcaat gt gaa 1200
 gt acaagaaa gacat t caaa at at gcat ga t ccagt t t ca gat ct cccaa at t t gt t gt t 1260
 t t t agacat gt t t t gaaag ccagcaaaat gct cagcggc cgagaat at a aaaagct ct t 1320
 t gaggaaaac aaaggaat gt at cat t t t ga t gcagat gct gt ggaacat c t gcacat aa 1380
 aggcaat gcc gt cct ccaaa gt caggt gaa at at aaagaa gaat at gaga aaaat aaggg 1440
 aaagccaat g ct t gaat t t g t t gagacacc at cat at caa gct t caaagg aggct caaaa 1500
 gat gcaaagt gaaaaagt t t acaaagagga t t t t gagaag gagat t aaag gaaggt cat c 1560
 act ggat t t a gacaagact c cagaat t t t t acat gt aaag t acat cacca acct t ct gag 1620
 ggagaaagaa t at aaaaaag at t t ggaaaa t gagat aaaa gggaaaggaa t ggaact t aa 1680
 t t cagaagt t ct t gat at cc aaagagcaaa gcgggcct ct gaaat ggcaa gt gagaaga 1740
 at acaagaaa gacct ggagt caat aat t aa agggaaagga at gcaagct g gcaact gacac 1800
 cct t gaaat g cagcat gcca agaaggct gc agagat agcg agt gagaaag act at aaaag 1860
 agat ct ggag act gaaat t a aagggaaagg gat gcaggt g agcacagaca ct ct t gat gt 1920
 ccagagagct aagaaagcat ccgagat ggc cagccagaaa caat acaaga aggact t aga 1980
 aat gaaat t aaagggaaaag gaat gcaagi gagcat ggat at cccagat a t cct t cgagc 2040
 caagaggaca t ct gaaat ct at agccagag aaagt at aaa gat gaagcag agaagat gct 2100
 t t ct aact at t ct accat ag cagat act cc t gaaat t cag agaat t aaga caact caaca 2160
 aaacat t agt gcggt at t t t at aagaaaga agt gggagct ggcact gcag t gaaagat ag 2220
 cccagagat c gaacgagt ga agaaaaat ca gcagaat at t agt t cagt ga aat acaaga 2280
 agagat t aaa cat gcaacag ccat t t ct ga t cct ccagaa ct aaagagag t t aaagaaaa 2340
 ccagaagaac at cagcaat c t ccagt at aa agagcaaaaac t acaaggcca ct ccggt aag 2400
 cat gaccccg gagat agaga gagt gaggcg aaaccaggag cagct gagt g cgggt aaaaat a 2460
 t aagggagaa ct t caacggg gaact gcaat t t ct gat cca ccagagct ga agagggcaaaa 2520
 agaaaaccag aaaaacat ca gcaat gt t t a t t acagaggt cagct gggaa gagct accac 2580
 t t t aagt gt a act cct gaaa t ggaaagagt gaagaagaat caagaaaat a t t agct cgggt 2640
 aaaaat at acc caggacat a aacagat gaa aggt agacca agt ct gat t t t agat acacc 2700
 t gct at gaga cat gt t aaag aagcacaaaa t cat at t t ca at ggt aaaaat accat gaaga 2760
 t t t t gaaaaa acaaagggga gaggct t t ac t cccgt cgt g gacgat cct g t gacagagag 2820
 agt gaggaag aacaccagg t ggt cagcga t gct gcct at aaaggggt cc accct cacat 2880
 cgt ggagat g gacaggagac ct ggaat cat t gt t gacct c aaagt t t ggc gcacagat cc 2940
 t ggct ccat c t t cgacct t g at cccct gga agacaat at t cagt ct agaa gt ct ccat at 3000

ES 2 380 753 T3

gct ct ct gaa aaggcgagt c act at aggcg acact ggi ct cgat cccat t ccagcagi ac 3060
 t t t cggg t aca ggt ct cggag acgacaggt c agaaat ct cc gagat t t acc ct agct t t t c 3120
 at gct gcagt gaggt aacaa gaccgt ct ga t gaaggagca cct gt t ct t c ccggagcct a 3180
 t cagcaaagc cat t cccaag gct at ggct a cat gcaccag accagt gt gt cat ccal gag 3240
 at caat gcag cat t caccaa at ct aaggac ct accgagcc at gt acgat t acagt gccca 3300
 ggat gaagac gaggt ct cct t t agagacgg cgact acat c gi caacgt gc agcct at t ga 3360
 cgat ggct gg at gt acggca cagt gcagag aacagggaga acaggaat gc t ccagcgaa 3420
 t t acat t gag t t t gt t aat t aat t at t t ct ccct gccct t t gagct t t at t ct aat gt at 3480
 cccaaacct a at ct t t t t aa aagat agaag at act t t t aa gacaact t gg ccat t at t t t 3540
 acaat gat gt at cct t cct t t gacaat t ag acacacaggt accaggaaga aggaat gacc 3600
 t ct gggct ga aaacagcagc at t t t cagt a at t cct acaa acaaaaat ct t t gt gt ct gg 3660
 acgcct ggt g ct gct aat t g t gt t cat ggt t t cct t t gat t ggct at t ga accct t ct gg 3720
 gaaat gt at t t t t gt agact t t aat agaga agt t gat t gt ccct t aat g t agcgt gt gt 3780
 t t gaaact t c t t agct gt ca ct t t ggaat c accccaagcc aat t ct ct t a act ct gt aat 3840
 gcagccaat a at acaaaccc gt t t t gct t t t t gagi cat ga ggcaat t t cc aat at t agt g 3900
 aaaaat t gcc aat at aat aa gt gt aaacag t ggcagaagg acagt ct ggt t aaaaat t at a 3960
 t t gact ggt g gcct t aggga t ct agaaact t ct act aaac agagaaat t t cct t gt t ccc 4020
 t aggt gact ggt at ct at t t at t t ct cat t t gt accaag gcat ct cct a ct ct ccat t t 4080
 at at t ct at g gacccaagt c t at gct cagt t ccacagaat gt caggacca aat aact t ca 4140
 cagct act ct gcaaagggca aat t at aat g t cat t gat at aat t t ccct a gt agcat t t a 4200
 ccct gt t gca t gt cat gt ag at t caagct t ct gt aacat a ggcagct gca ct gcgcgt t c 4260
 ct at t at t ga agcaaaaagg gt gact gat a cct aaaagcc ct t t ct t cct ct agt cgcca 4320
 gct cat caga aaaacat act t t gaaaagat gct t gagat t t t cct gct gc at cgcact ct 4380
 agt t t ggaag gat t t acal c t t aggaaat a acat gt at ac t ct agt aat aagcgal t t a 4440
 ggt gt t ccal t gaacagct t t gat t aact t aat gccacca t t gat t t caa agt gaagaaa 4500
 at gt aacaga agccagt gaa gcaat ggaag ct ggagt gt g act ggaaaaa t act cagcaa 4560
 acaaagt t ac caat t ccal a cagagat gat ct ggt gt ct t ct t t t ggaaa at ggt at t ca 4620
 aat t ct ggaa t ggaaat ct a gccaccaaaa cgggt t aat c aaaagacgt c ct t t t ccgt t 4680
 t t t t t gct t t t at t t t ct a aat cat t t t t aagggaaat ga aacaggaat g t cat cagaga 4740
 t t t t t agt a caggcccaag agcct gt act ct aagaaaga aat t t t t gcc at gt at gaat 4800
 t t t cgaat aa gt gact t t gc aggc t t t t gc t agccct t gc t ggt ggt ct ggaaat t aca 4860
 t ccagagt ct gcagt ccagg t caccaagcc agcggcaccc gt cggcaacc ct gt gt t t aa 4920
 cggat t gt gc cgt t t act gt gacct gcaac ggggt ggcct t cact t aggg t ct gact t ca 4980
 cagct at gac aaaaccgaaa aagcaaaaact gcgaggaagt gct aagat gt acgggt ct t g 5040
 gggat at ct g cct t at at gt t at at t caag gaaat t aacg aaacat cct g t gaaacat cg 5100

ES 2 380 753 T3

t t t a a g g a a a c g t t t a c t a g t c c a a a g g c c a a a g c t a a t t t a t t t c c a c t t t a g a a a a g t 5160
 t a g c a c a t g c t t t t g a a a a t c t g t g a t t t c a t t t t a t t a g g c t a a a a g g g t a a a t a g g c t 5220
 t t a t t a c a c t g a a g c t g c a t c t a t a t g t c a c t g a c a t a a a g t t g a a a a a a t a a a t g c a g g 5280
 c a a a t a a c t a g a g a c t t c t t t t a a g g g g g t t t g g c t g g t t t c t c t c a c t g a a a t g g c c a g 5340
 t c g t g a t t a a a g t g a t a a a a c c c c a t a t c t g t t t t g g t a t a t t g t a c a c a a a c c t a c a a a 5400
 a a t a a a c t g a a c t t g c a a t a t t t t t g c a a t a a a a t c t g t c g t t a a a a c t g a g g a t a a a a t 5460
 a c c t g c t c a a t t t t a t t t t a c t a a g t a t a t a t t t a c a t t t c a c c c a g g c a g g c c a t t t t c 5520
 t t t t g t g a t t a t a a g a a a g a g t a g t t g t t g a t t a a a t t t t c a g a c t a a a t a t a g g a c a g g 5580
 t a c a a t t t t g g a t a a a t a g c a g a t t t a t a a g a a c c g c a a t g a a a a c t g a c t t t g a a a t a a t 5640
 g c t t g t a a t c a g g a a a g t a a t t t c a t c c a c c g a t t t c a a a a c c a g a t t c a c t g a g c a t a a 5700
 a a g t c a a t a c a t a t t t g a g g a a t a a g t c t c c t a a a a t t t t a a g c t t c a c g t a a t a a t g t t 5760
 t g c a t a g c a a a a t a t t t c t g c t t c a a g c c t t t a g g a a t t a a g a t c t g a t c a g a a t t t a a c 5820
 t a a a g g g t a g t t g t t t t a c a a t g a a g a c t a a a a c t g a a c a a g a t g t t g c a t g c g c t t a g g 5880
 c c a t a a t t t g g t a g t g t t g g c a g t t g t t a a t a a a g c t t g t c a g g a t g t t a a g c a t c t c a g 5940
 g a g a a a t a t t g g a a a a t t a t a t g t a t a a a a c c a a a g t g c t g t t t t a a a a g c a t c a t t t a 6000
 a a a a a a a a t g a c a t g c c t g a a c a a c t t t t c c a c t t t c c a c g t g c t t c c c t c c c a c c t t t g 6060
 g t t t g g c a a c a g g t a t c t c g t g c a t g a a g c t g a c a g c t a a a g a a g a t t t t a a a a a t t g a g 6120
 t t a a a g a t g a c t g t g t a a a t g t c c a a g c a c a g a g a g c a t g c a c c t g a c t t t c t a a a g t t t 6180
 g a t g t g t t c t c a a g c c t g a c a g a a g c a c a a g g a a c a g t t t g a t a c a c t t t t a a a a g g t t c 6240
 t g a a a c a a a g c t g t a t a g g g a t c c t c t c t c t c t t g a g c a a a g t a t a g c a a c a g a a t a t a 6300
 t t g c t t t t g t t g t a a g c t t t t g t a g t a c a t g t t t t a c t a a t a a t t c t t g t t c t c t a g a a 6360
 a g c t t t c t a t t t c t a a c c t a t g g c a a a a t g a a t c c t t c a t g t c t t c t t g t t a t t g t t t a c 6420
 a c a c t t g c a g t g t a g c c c a g t t t t g a a a t a t t t a t t t g g t t a t c a a c t g c c a t g g a g g a g 6480
 g c t c t t g a t g a t c c c a g g t c t c c t c g a c c t c c a t a c a c c a c a c a g g c a t t t g t a a g c a c a 6540
 g t t t c c a c a a g c a c c t t g t a g g a a t a t g g a t a a g a t t a g a c c a g c c c c t c t c t g t c c a c t 6600
 g g g t t t a t t t c t t g a a g a a g a t g c a g a t c t g g t t t t t c c a a t g t g c c a c a g t c t t t c c t t 6660
 a t c c t c t c c a t g c t g a g c t t g a c a a c a c t c t g g g a a t g a g g a c a a g a c t t t t t c t a a a a 6720
 a g a t a g t g g a a g t t c a a g g g a t g t a c c t c g t t t t c a g g t t c a t c c a t c t c c a g t g g a a t g 6780
 t t t t c a a t a a a a g a t g a a g a a a a t g t g t g t g a t c t t t a a t a a c a c a t c c c t a t a g a a a g t 6840
 g g a t a a a a g a t a t a c c a a a a c t g t a a t a c a g a t a t a c a a a t a t a g g t g c c t t t t t g a t 6900
 t a c t c t t g t t t g t c t a g t a t g c t c t t g g a a a g a a a a c c a a g c a a g c a a g t t g c t g c c t a t 6960
 t c t a t a g t a a t a t t t t a t t a c a c a t g a t t g a t a t a t t t t t g t g g t a g g g a a g t g g g a t g c t c 7020
 c t c a g a t a t t a a a g g t g t t a g c t g a t t g t a t t t t a t c t c t a a a g a t t t a g a a c t t t a g a a 7080
 a a t g c c g a c t t c t t c c a t c t a t t t c t g a a a g g t t c t t t g t g g a t t t a t a t a g a g t t g a g c 7140

ES 2 380 753 T3

t at at aaaca t t aact t t ag at t t gggat t t aaaat gcct at t gt aagat agaat aat t g 7200
t gaggct gga t t cact acac aagat gaact t cact t cat a aat t aat t at acct t agcga 7260
t t t gct t ct g at aat ct aaa agt ggct aga t t gt ggt t gt t t t ggt t aag gt gat at gga 7320
ggg gggagag ct t t t agt t a agt aagaagc t at gt aaact gacaaggat g ct aaaat aaa 7380
agt ct ct gaa gt at t ccat g cct t t t ggac cct t t cct cg caact aact g t caact gt t g 7440
at caaaaaag t caaggcat t gt at gt t gct t ct gt ggt t a t t at t ct gt g at gct t agac 7500
t act t gaacc cat aaact t g gaagaat ct t t gagcaaat t t t ct cagt t g t ct gt at gac 7560
t t cagt at at t cct gggat gccat aggat t t t t t gt gct t gat acat gg t at ccagt t t 7620
gcat agt at c act t ct t t gt aat ccagt t g ct gt t aagaa t gat gt act t t aaaggaaaa 7680
gagaaaact g cat cacagt c ccat t ct cca gt gt ccat gc aat gaat t gc t gagcat t t a 7740
ggaagcagca ccaagt ct at t acaggcat g gt gt gaaact t gat gt t t ga cct gt gat ca 7800
aaat t gaacc at t gt acagt t t ggct t ct g t t t gct t caa aat at gt aga at t gt ggt t g 7860
at gat t aat t t gcgagact a act t t gagag t gt aacagt t t t gaagaaaa cat t gaat gt 7920
t t t acaaat g aaggggct t c acggaat gt t acaat gt t ac t aat at aat t t ggct t t t gt 7980
t at gcaaat t gt t aacacca gct at t aaaa t at at t t t ag t agaaaaaaa aaaa 8034

<210> 16

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo para HAPLN1

<400> 16

t gaaggat t a gaagat gat a ct gt t gt g 28

10 .<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador inverso para HAPLN1

<400> 17

gccccagt cg t ggaaagt aa 20

<210> 18

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para HAPLN1

<400> 18

25 t acaaggt gt ggt at t cc 18

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador directo para MFAP5

<400> 19
cgaggagacg at gt gact ca ag 22

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador inverso para NFAP5

<400> 20
agcgggat ca t t caccagat 20

<210> 21
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de la sonda para MFAP5

<400> 21
acat t cacag aagat cc 17

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador

<400> 22
gccaaagt gt t t t cacacag 20

<210> 23
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador

<400> 23
t aat acgact cact at aggg gccaaagt gt t t t cacacag 40

<210> 24
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 24

ct ct gaagca gt agacacca 20

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 25

cct agcct gg ct t t ct t gct c 21

<210> 26

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 26

t aat acgact cact at aggg cct agcct gg ct t t ct t gct c 41

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 27

ccat t gggt c t ct gcaaat c c 21

REIVINDICACIONES

1. método de evaluación de la composición de un cultivo celular, comprendiendo el método lo siguiente:
- 5 a) obtener un conjunto de células diversas de un cultivo celular;
- b) determinar el nivel de expresión promedio de un marcador fibroblástico en un conjunto diverso de células entre las que el citado marcador fibroblástico es la proteína microfibrilar asociada 5 (MFAP5); y
- c) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión promedio de la proteína microfibrilar 5 asociada (MFAP5); donde el nivel de expresión medio de MFAP5 por debajo de un determinado umbral indica que el cultivo celular incluye condrocitos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el marcador fibroblástico MFAP5 es tal que sus niveles de expresión normalizados son inferiores en condrocitos transferidos que en fibroblastos dérmicos o en sinoviocitos.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar el nivel de expresión medio de un marcador condrocitario en el conjunto de células diversas; y, en el paso c) determinar la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión promedio del marcador condrocitario y en el nivel de expresión promedio del marcador condrocitario y fibroblástico MFAP5.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que el marcador fibroblástico MFAP5 y el marcador condrocitario son tales que la proporción de sus niveles de expresión (marcador condrocitario respecto al marcador fibroblástico) en condrocitos es superior o igual a 5 veces la proporción en fibroblastos dérmicos o sinoviocitos.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el marcador condrocitario se selecciona entre los marcadores condrocitarios enumerados en el grupo siguiente:
- 20
- Proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano (HAPLN1)
 - Proteína Gla de matriz (MGP)
 - Repeticiones tipo GF y dominios tipo discoidina I 3 (EDIL3)
 - Proteína 3 de señal inducida por WNT1 (WISP3)
 - Agrecano 1 (AGC1)
- 25
- Proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP)
 - Colágeno de tipo II (COL2A1)
 - Colágeno de tipo IX (COL9A1)
 - Colágeno de tipo XI (COL11A1)
 - Quimiotaxina 1 derivada de células leucocitarias (LECT1)
- 30
- Proteína beta fijadora de calcio S 100 (S100B)
 - Proteína ácida cartilaginosa 1 (CRTAC1)
 - Proteína 9 de la caja SRY (SOX9)
 - Nebulette (NEBL)
6. El método de la reivindicación 3, donde el marcador condrocitario es el HAPLN1.
- 35 7. El método de la reivindicación 3, donde los niveles de expresión del marcador fibroblástico MFAP5 y los marcadores condrocitarios están determinados a nivel del ARN.
8. El método de la reivindicación 7, donde los niveles de expresión se determinan usando PCR.
9. El método de la reivindicación 8, donde los niveles de expresión se determinan usando el método C_T PCR.
- 40 10. El método de la reivindicación 3, donde una proporción del nivel de expresión del marcador condrocitario respecto al marcador fibroblástico MFAP5 superior a 0,25, determinada mediante el método de la C_T PCR comparativa, indica que cultivo celular contiene condrocitos.

11. El método de la reivindicación 10, donde la citada proporción indica que cultivo celular contiene al menos un 50 % de condrocitos.
12. El método de la reivindicación 3, donde una proporción molar del marcador condrocitario respecto al marcador fibroblástico MFAP5 superior a 0,55, indica que cultivo celular contiene condrocitos.
- 5 13. El método de la reivindicación 12, donde la citada proporción indica que cultivo celular contiene al menos un 50 % de condrocitos.
14. El método de la reivindicación 1, donde el cultivo celular comprende células obtenidas a partir de una biopsia de cartílago.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, donde la biopsia de cartílago se obtiene de una articulación de la rodilla.
16. método de evaluación de la composición de un cultivo celular, comprendiendo el método lo siguiente:
- a) aislamiento de células de biopsia de cartílago procedente de mamífero;
- b) cultivo de células aisladas en el paso a) en un cultivo celular;
- c) obtención de una muestra de cultivo celular;
- 15 d) determinación del nivel de expresión de MFAP5 y HAPLN 1 en una o más células de la muestra; y
- e) determinación de la composición del cultivo basándose en el nivel de expresión de MFAP5 y HAPLN1.
17. El método de la reivindicación 16, donde los niveles de expresión de MFAP5 y HAPLN1 se determinan a nivel del ARN.
18. El método de la reivindicación 17, donde los niveles de expresión se determinan usando PCR.
- 20 19. El método de la reivindicación 18, donde los niveles de expresión se determinan usando el método C_T PCR comparativo.
20. El método de la reivindicación 16, donde una proporción del nivel de expresión del HAPLN1 respecto a MFAP5 superior a 0,25, determinada mediante el método de la C_T PCR comparativa, indica que cultivo celular contiene condrocitos.
- 25 21. El método de la reivindicación 20, donde la citada proporción indica que cultivo celular contiene al menos un 50 % de condrocitos.
22. El método de la reivindicación 21, donde una proporción molar del HAPLN1 respecto al MFAP5 superior a 0,55, indica que cultivo celular contiene condrocitos.
- 30 23. El método de la reivindicación 22, donde la citada proporción indica que cultivo celular contiene al menos un 50 % de condrocitos.

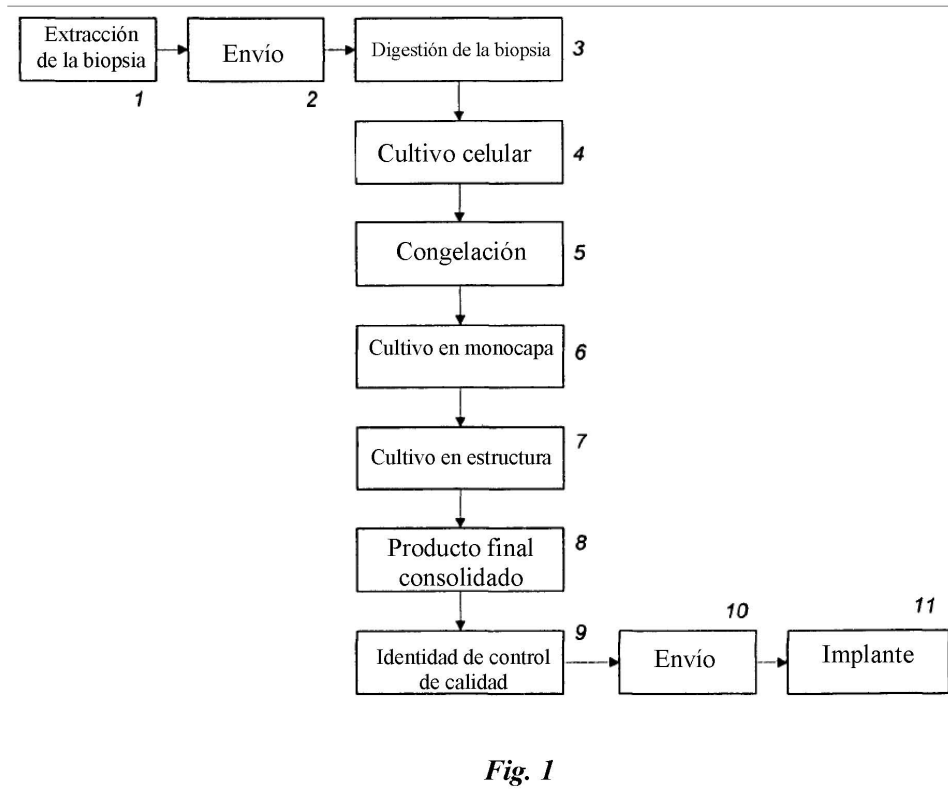


Fig. 1

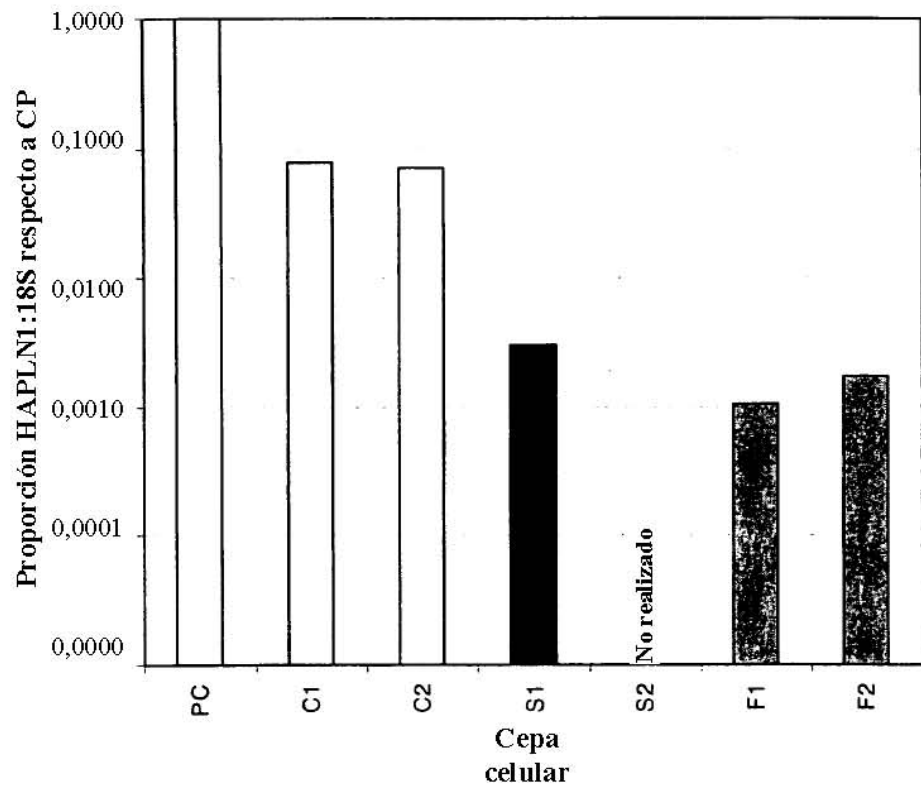


Fig. 2

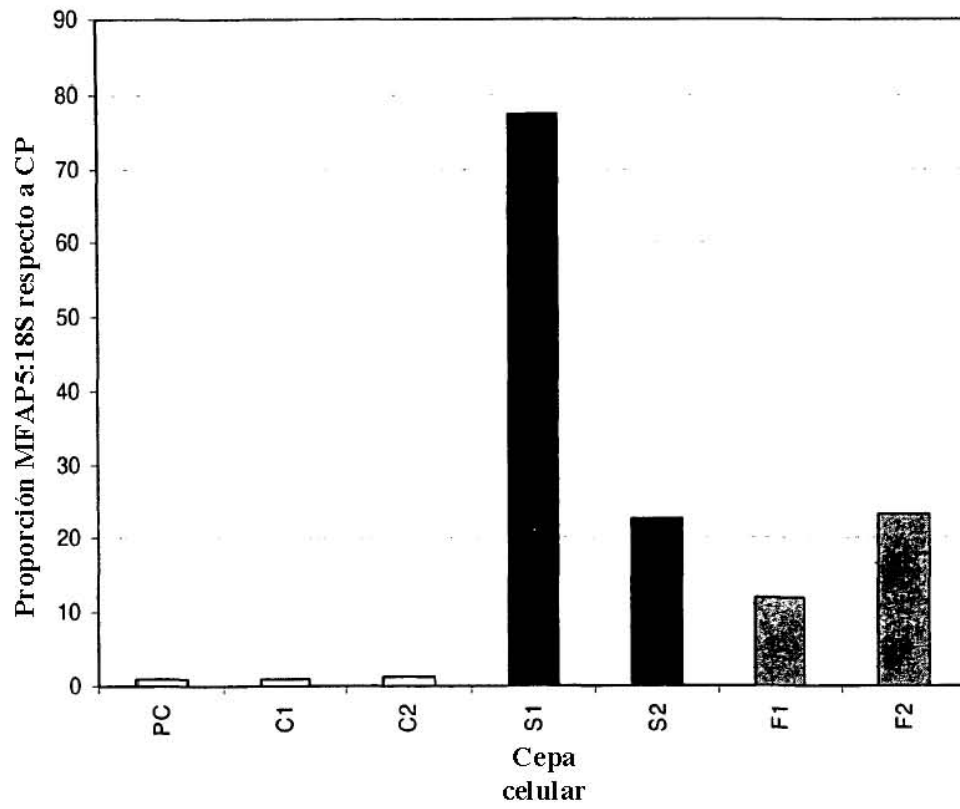


Fig. 3

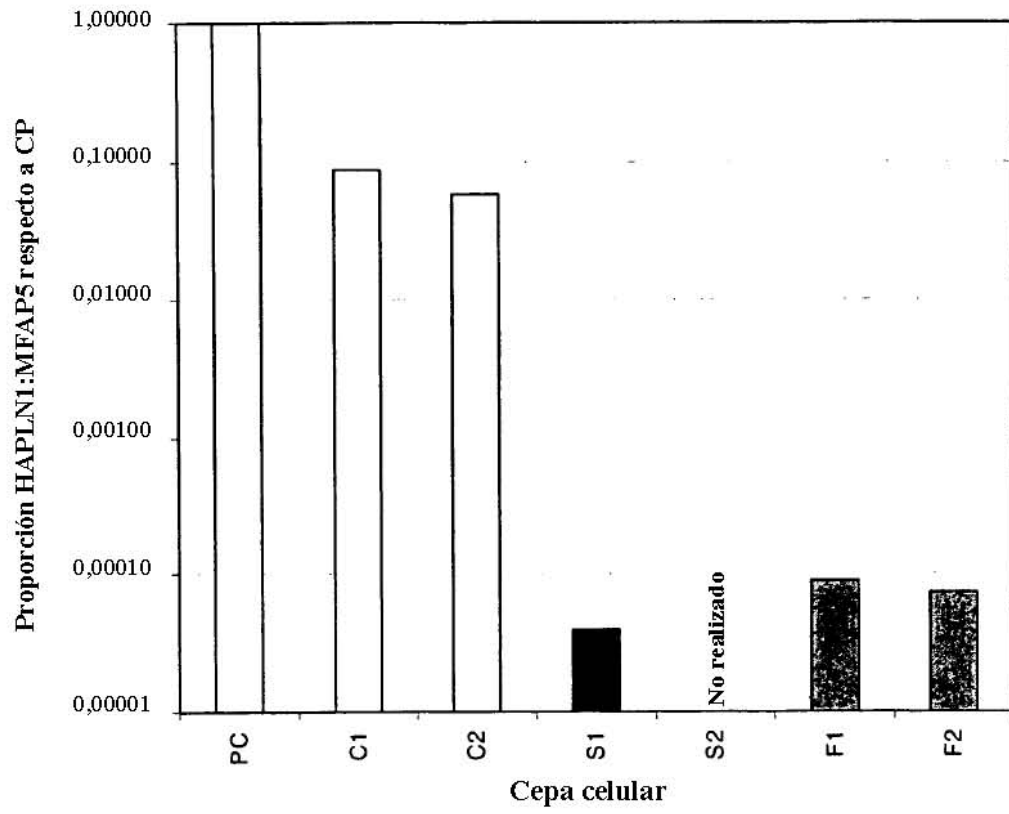


Fig. 4

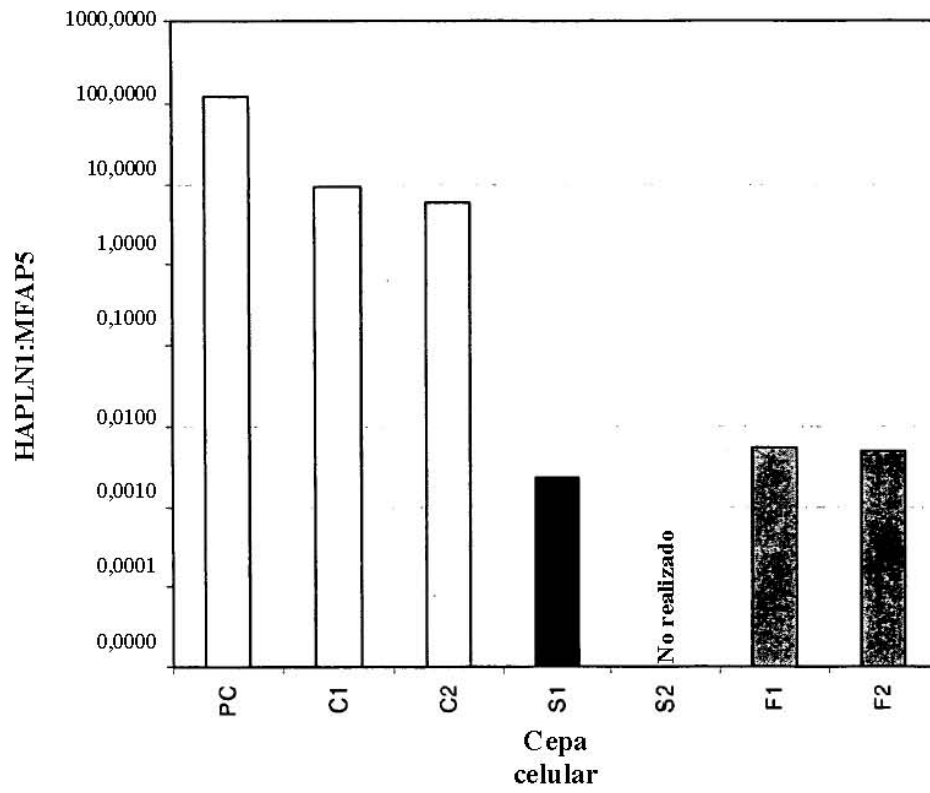


Fig. 5

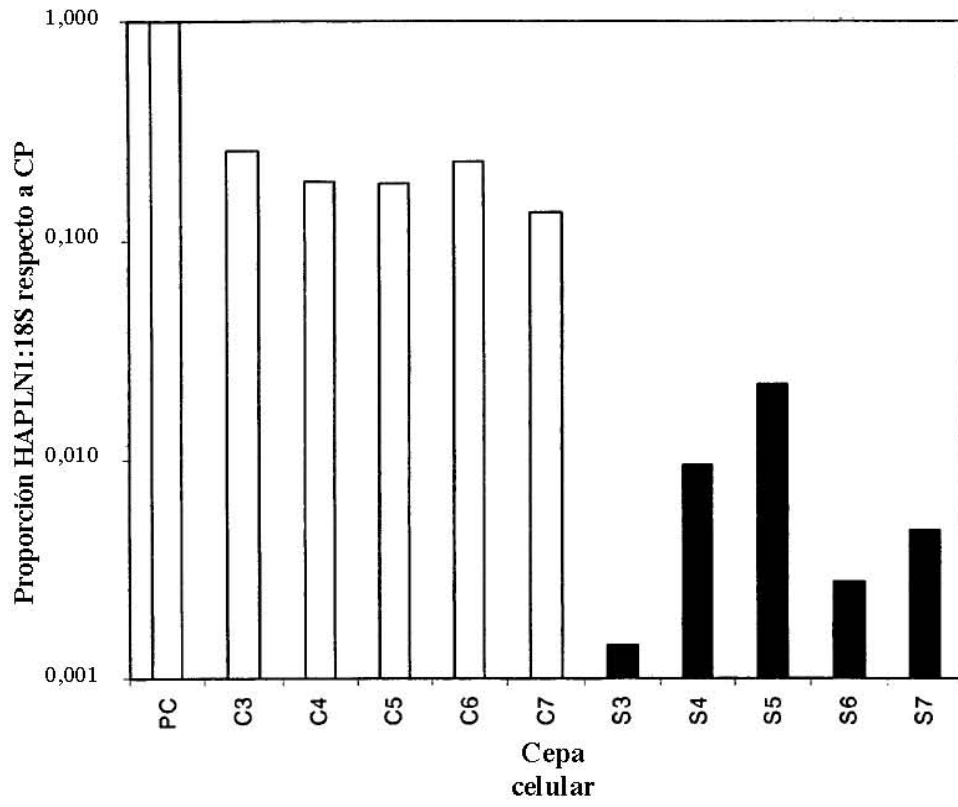


Fig. 6

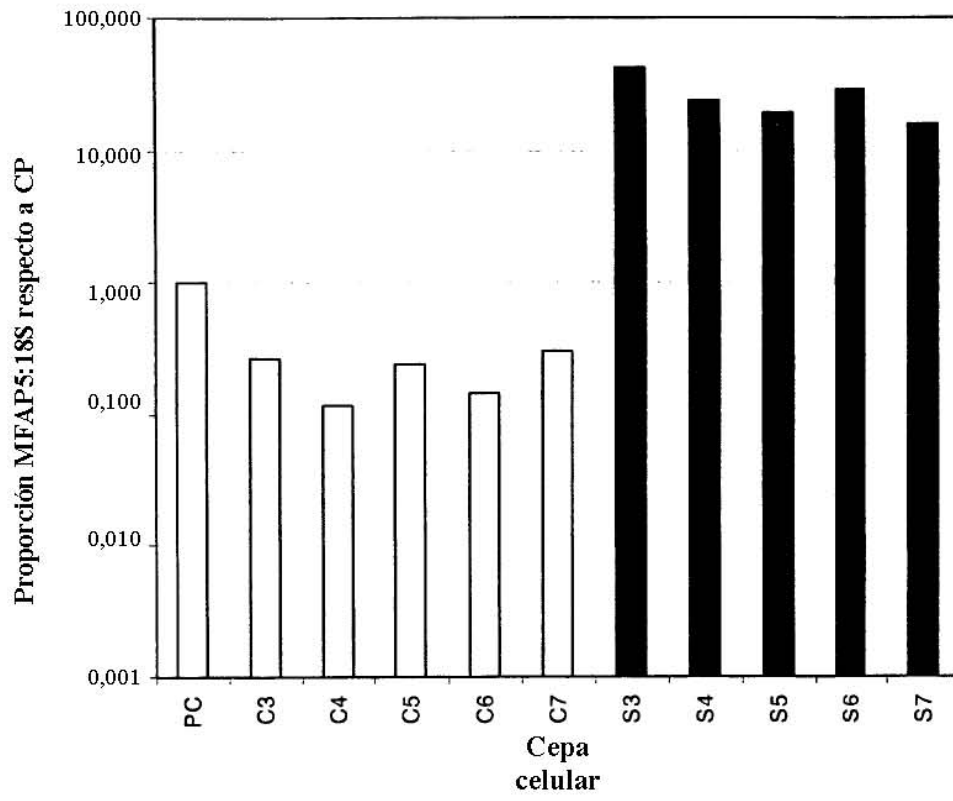


Fig. 7

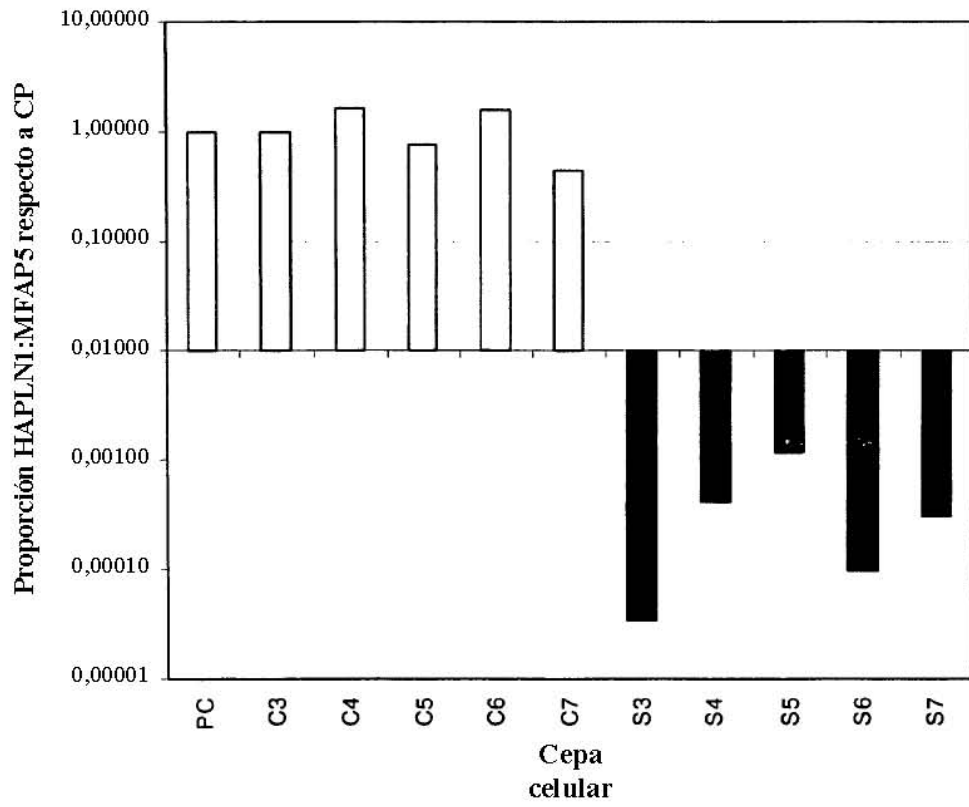


Fig. 8

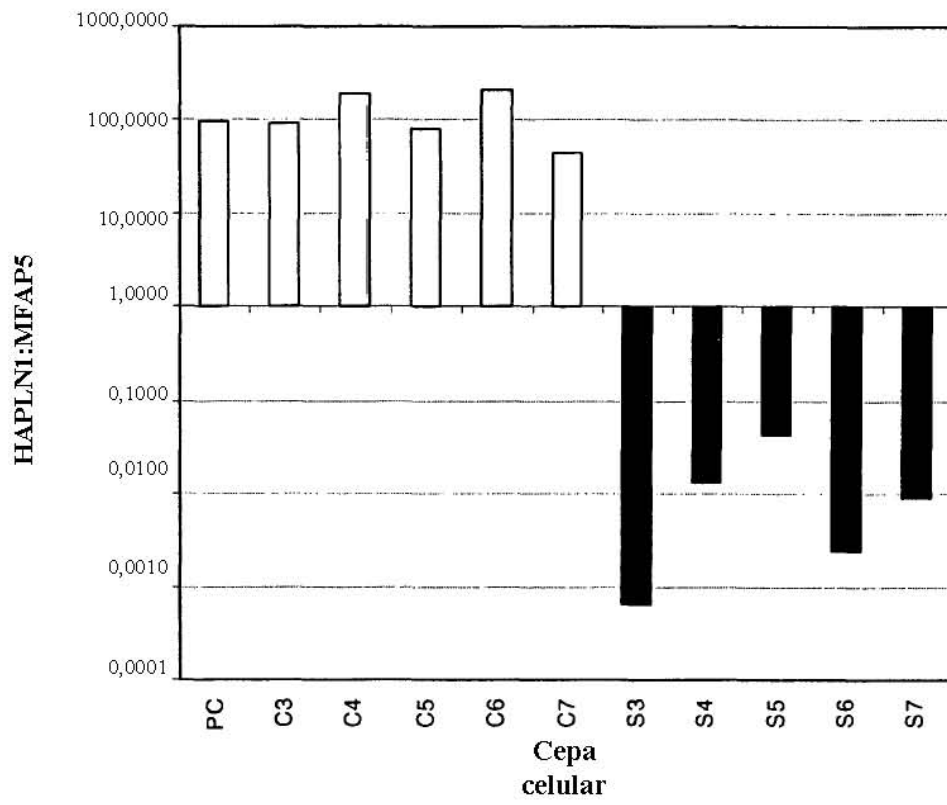


Fig. 9

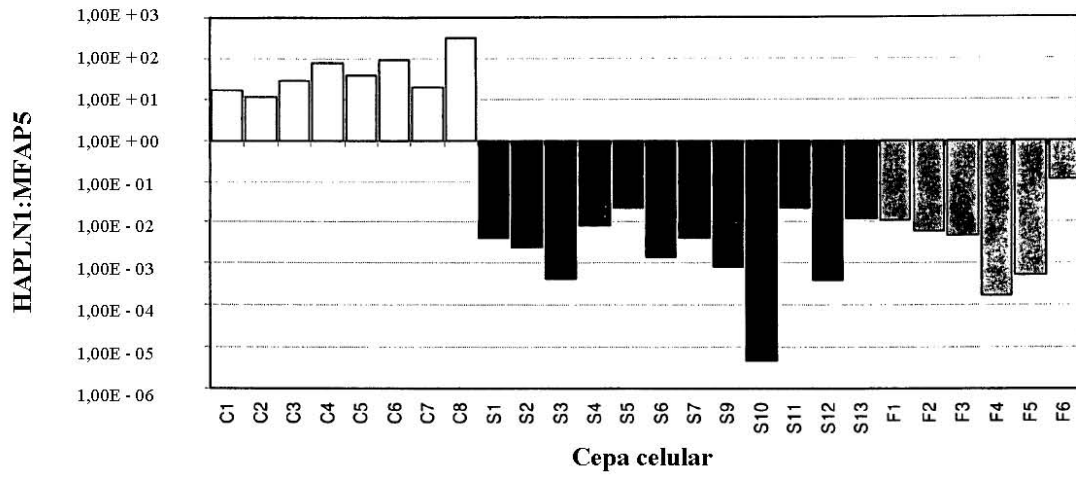


Fig. 10A

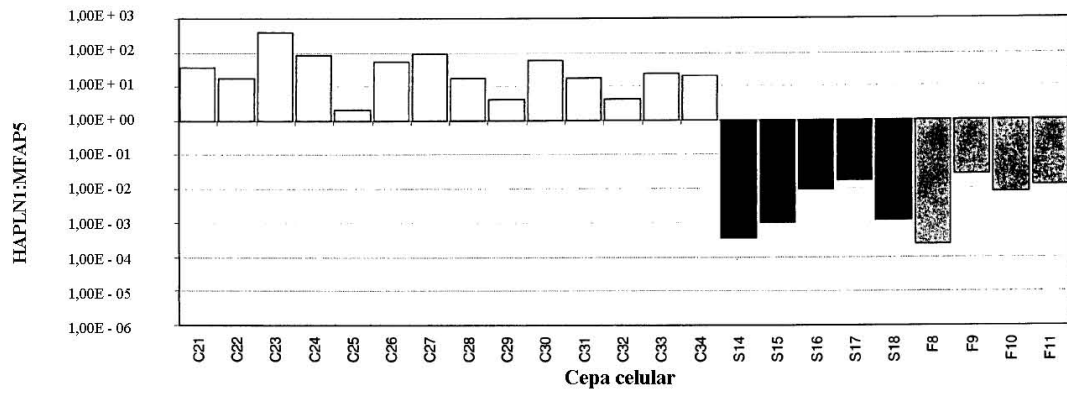


Fig. 10B

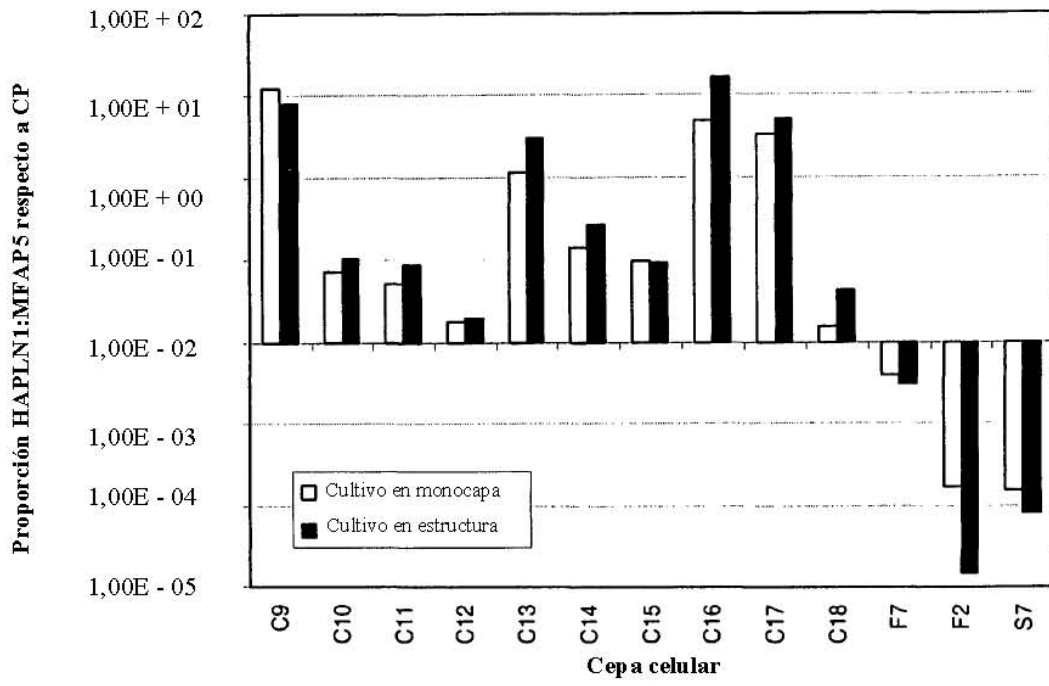


Fig. 11

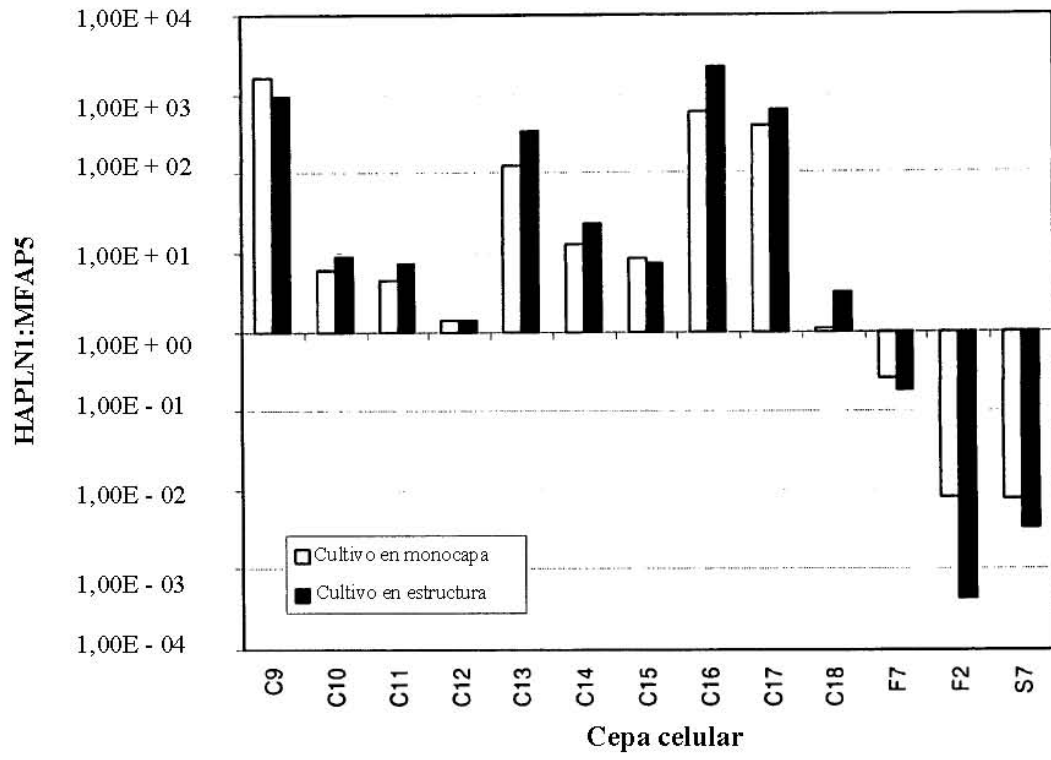


Fig. 12

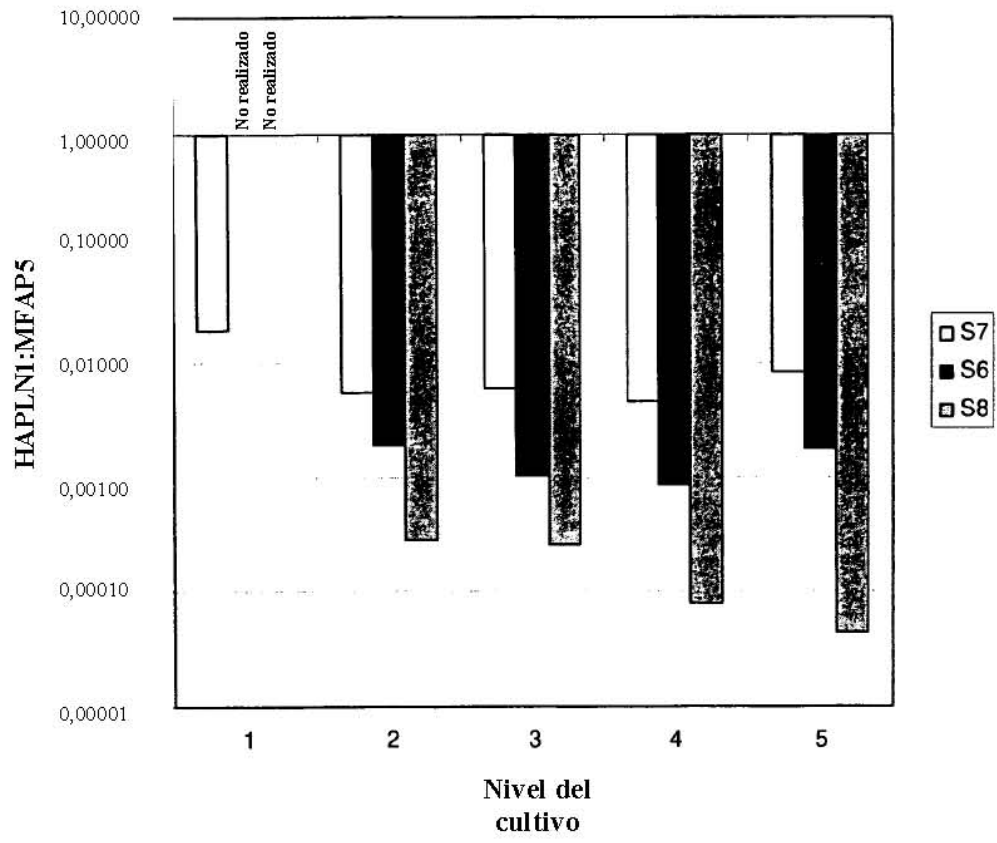


Fig. 13

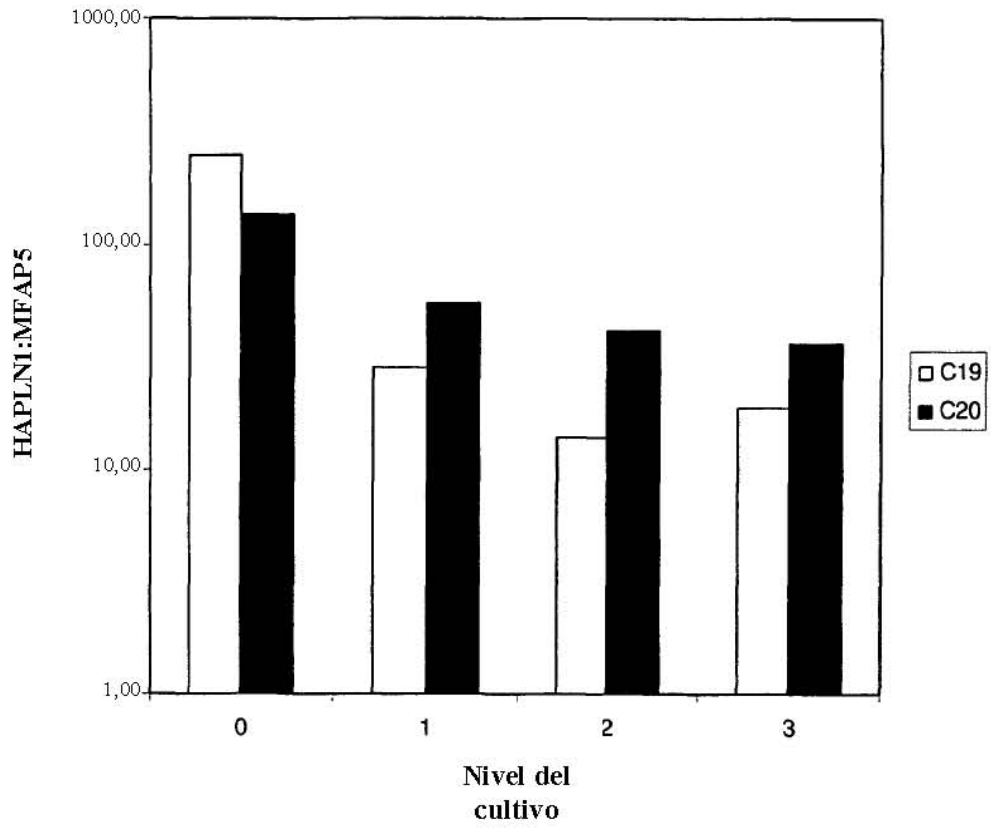


Fig. 14A

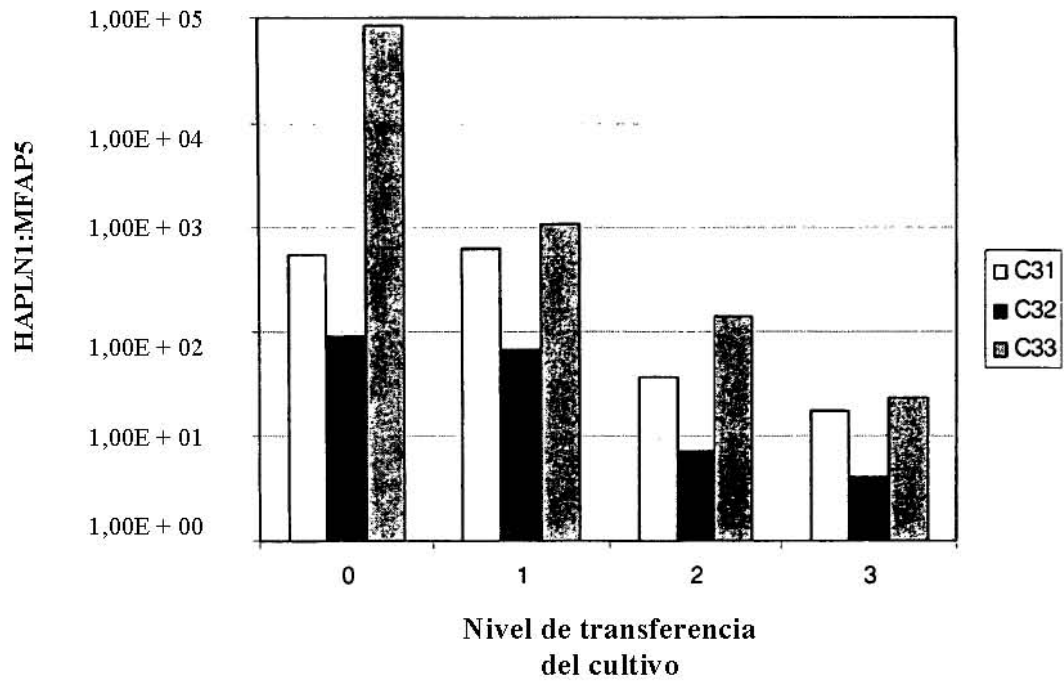


Fig. 14B

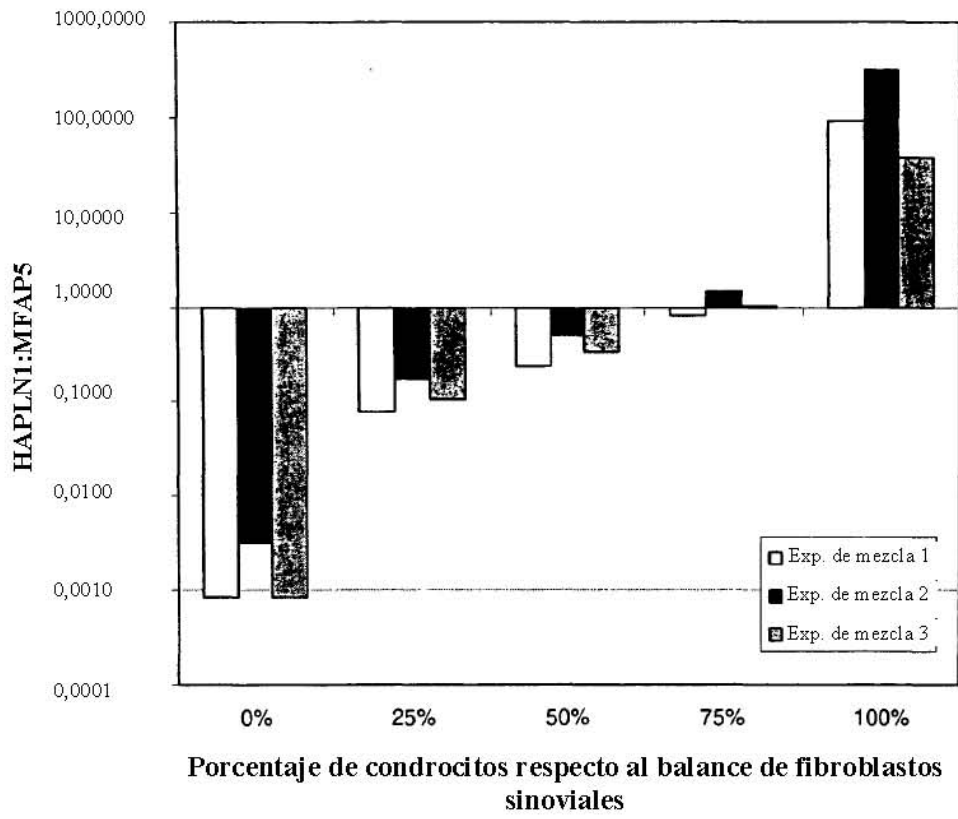


Fig. 15

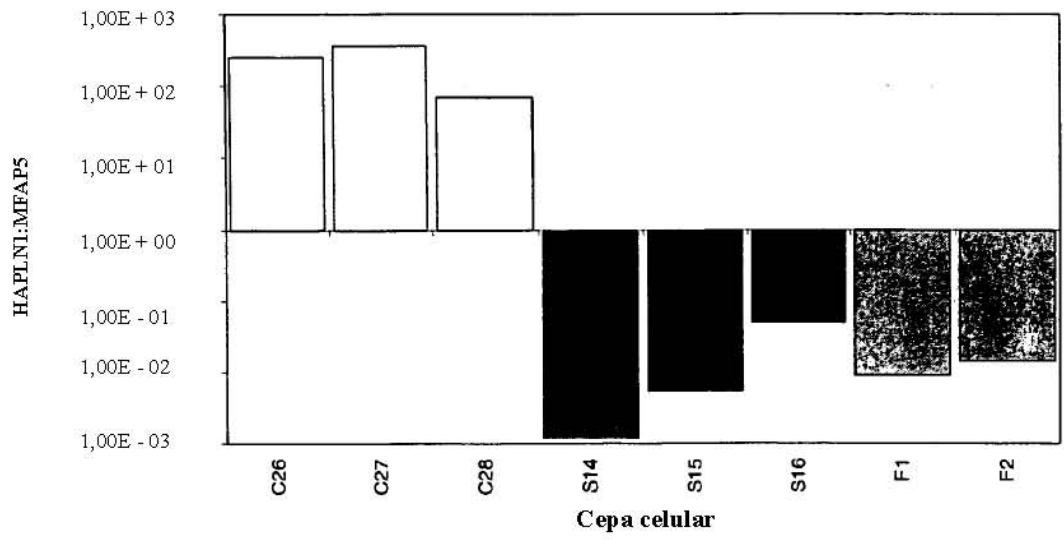


Fig. 16