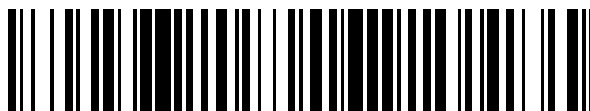


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 178**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10725083 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2451968**

54 Título: **Método isotérmico rápido altamente sensible para la detección de mutaciones puntuales y SNP, conjunto de cebadores y kit para el mismo**

30 Prioridad:

**10.07.2009 EP 09165252**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.05.2015**

73 Titular/es:

**DIASORIN IRELAND LIMITED (100.0%)  
Unit 13/14 Holly Avenue, Stillorgan Industrial  
Park, Blackrock  
Co. Dublin, IE**

72 Inventor/es:

**ADLERSTEIN, DANIEL;  
AMICARELLI, GIULIA y  
MINNUCCI, GIULIA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 535 178 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

Método isotérmico rápido altamente sensible para la detección de mutaciones puntuales y SNP, conjunto de cebadores y kit para el mismo

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para detectar una mutación puntual o un SNP en una secuencia de nucleótidos por medio de un método de amplificación por LAMP (polimerización mediada por amplificación por bucle) mejorado, así como a un conjunto de cebadores y a un kit para llevar a cabo el método de la invención. Según una realización no limitativa, el método, el conjunto de cebadores y el kit son adecuados para detectar la mutación G1849T (V617F) en el gen JAK2.

10

**Antecedentes de la invención**

15

Los trastornos mieloproliferativos (MPD) son trastornos clonales de progenitores hematopoyéticos, e incluyen los MPD clásicos leucemia mieloide crónica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis primaria (PMF), así como leucemia eosinófila crónica (CEL), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y mastocitosis sistémica (SM) y otros. En las últimas dos décadas, se han identificado alelos mutantes en CML, CMML, CEL y SM2-5, y en cada caso la mutación causante da como resultado la activación constitutiva de la señalización por tirosina cinasa. Las causas genéticas de los MPD más comunes siguieron siendo desconocidas hasta la identificación de mutaciones que activan la señalización por la cinasa Janus 2 (JAK2) en la mayoría de los pacientes con PV, ET o PMF(1, 2, 3, 4). JAK2 es un miembro de la familia Janus de tirosina cinasas no receptoras citoplasmáticas, que también incluye JAK1, JAK3 y TYK2. La mutación es una sustitución de guanina a timidina en la posición 1849 en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GenBank NM\_004972, SEQ ID NO: 1), comenzando la numeración en el codón de iniciación ATG, correspondiente a la posición 2343 de SEQ ID NO: 1. Una mutación de este tipo da como resultado una sustitución de fenilalanina por valina en el aminoácido 617 de la proteína JAK2 (JAK2V617F), dentro del dominio pseudocinasa JH2 (5). La pérdida de autoinhibición de JAK2 da como resultado la activación constitutiva de la cinasa, de manera análoga a otras mutaciones en MPD y leucemia que activan de manera aberrante tirosina cinasas (6, 7, 8).

20

25

30

La secuenciación directa sólo es sensible hasta aproximadamente el 20% del ADN mutante en un contexto de tipo natural (9, 10). Esta cuestión es bastante relevante para trastornos mieloides crónicos, en los que la sangre y la médula están compuestas a menudo por una mezcla de elementos hematopoyéticos normales residuales y neoplásicos. Éste es especialmente el caso de ET y MDS, en los que pueden estar presentes mutaciones génicas evidentes fenotípicamente en clones diminutos que comprenden menos del 10% de la población de células de médula total. James *et al.* (11) investigaron esta cuestión específicamente con respecto a 1849 G-T de JAK2 realizando una serie de experimentos de mezclado con células de eritroleucemia HEL, que portan la mutación de JAK2, mezcladas con células de eritroleucemia TF-1, que no la portan. No pudieron detectar el alelo mutado cuando estaba presente en <5% del ADN total. Con ADN de paciente mutante homocigoto diluido en ADN de una persona sana, la secuenciación era incluso menos sensible (10%) de lo que era con las líneas celulares (12).

35

40

Un método común usado para la detección de mutaciones de ácidos nucleicos es el sistema de amplificación resistente a la amplificación (ARMS). Se aprovecha del hecho de que los cebadores de oligonucleótidos deben aparearse perfectamente en sus extremos 3' para que una ADN polimerasa extienda estos cebadores durante la PCR (12). Diseñando cebadores de oligonucleótidos que se aparean sólo con una mutación puntual del ADN específica, tal como la que codifica para V617F de JAK2, ARMS puede distinguir entre alelos polimórficos. Por tanto, a estas técnicas se les dan los nombres alternativos de "PCR específica de alelo" (AS-PCR) o "PCR de cebador específico de secuencia". La sensibilidad de ARMS es de hasta del 1 al 2% (13) de ADN mutante en un contexto de tipo natural.

45

50

La monitorización en tiempo real de la acumulación de productos de PCR durante el termociclado puede ser valiosa como método semicuantitativo y pueden usarse ensayos de curvas de fusión de ADN conjuntamente con PCR en tiempo real. Asimismo, James *et al.* (14) compararon la secuenciación mediante química de colorantes fluorescentes con dos sistemas de detección de mutaciones basados en PCR en tiempo real diferentes, uno que usaba un instrumento LightCycler (Roche Diagnostics) y otro que usaba una máquina Taqman ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Estas técnicas de PCR en tiempo real detectaron del 0,5 al 1% de ADN de la línea celular HEL diluido en ADN de la línea celular TF-1 y del 2 al 4% de ADN de paciente mutado de manera homocigota diluido en ADN de una persona sana.

55

60

Es posible un análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) puesto que la mutación 1849 G-T de JAK2 suprime un motivo en la secuencia de JAK2 de tipo natural que se reconoce por la enzima de restricción *Bsa*XI. Aunque la supresión de un sitio de restricción no es tan satisfactoria como la creación de un nuevo sitio, debido a que una reacción de escisión enzimática negativa podría deberse o bien a la ausencia de la mutación o bien a un fallo del procedimiento de digestión, puede ser útil como análisis de primer paso. La sensibilidad proporcional notificada depende en parte del método usado para detectar los fragmentos y es de aproximadamente

65

el 20% de ADN mutante en un contexto de tipo natural (15, 16).

La pirosecuenciación es un método de genotipado rápido que depende de la liberación de pirofosfato (PPi) siempre que se incorpore un dNTP a una cadena de ADN en crecimiento durante la polimerización de ADN dirigida por molde (17). Varios grupos (17, 18) han intentado la pirosecuenciación de JAK2 usando el sistema automatizado PSQ HS 96 (Biotage, Uppsala, Suecia) con experimentos de dilución similares a los descritos anteriormente mostrando una sensibilidad del ensayo notificada del 5 al 10% de alelo mutante en un contexto de tipo natural.

Se han descrito otras varias técnicas de detección de mutaciones, incluyendo análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), cromatografía de líquidos de alta resolución desnaturalizante (DHPLC), ensayos de extensión de cebador de un solo nucleótido (Pronto), y otros. De hecho, la DHPLC puede detectar la mutación de ADN genómico que subyace a V617F de JAK2 de manera fiable, y puede detectar mutaciones a una proporcionalidad de <1 al 2%. Sin embargo, la DHPLC y las otras técnicas o bien suponen un desafío técnico o bien requieren mucha mano de obra o ambos. O bien no permiten una alta producción a un coste adecuado para un laboratorio clínico (SSCP y DGGE) o bien requieren una inversión inicial considerable en equipo (DHPLC).

Teóricamente, también podrían usarse técnicas basadas en proteínas para detectar la mutación V617F de JAK2, pero éstas son generalmente engorrosas, y el acceso a tales recursos es limitado. Por tanto, habitualmente no se prefieren ensayos basados en proteínas si son viables pruebas basadas en ADN o ARN.

La solicitud de patente europea EP1692281A da a conocer un método para la detección de la mutación G1849T de JAK2 basándose en amplificación por PCR.

Los documentos de la técnica anterior WO2009/049630, Nagamina *et al*, (Molecular and Cellular Probes (2002) 16, 223-229), US2007/0218464 y EP1975249 dan a conocer métodos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) que emplean además de los cebadores externos F3 y B3, los cebadores internos FIP y BIP y también los cebadores de bucle LB o LF.

Los métodos de la técnica anterior muestran varias limitaciones. En primer lugar, el menor nivel de sensibilidad, que permite la detección de la secuencia de JAK2 mutante hasta el 1% de la muestra en los mejores casos. Una sensibilidad de este tipo requiere el enriquecimiento de los mutantes por medio de aislamiento de granulocitos antes de la extracción. Ésta es una etapa que requiere mucho tiempo y mano de obra que da como resultado aproximadamente 2 horas adicionales para los procedimientos ya largos (de desde 2 hasta 5 horas) requeridos para el diagnóstico. Además, todos los métodos ilustrados anteriormente son relativamente caros y requieren mucha mano de obra, requiriendo a menudo equipo especializado que no siempre está fácilmente disponible.

### Descripción de la invención

Los presentes inventores han establecido un método de LAMP novedoso de detección de una mutación puntual o un SNP en una molécula de ácido nucleico, que es particularmente selectivo y rápido. Los presentes inventores han establecido también un conjunto de cebadores novedoso y un kit para llevar a cabo el método de la invención. El método para detectar una mutación puntual o un SNP de ácido nucleico y el conjunto de cebadores y el kit para el mismo se caracterizan por las características definidas en las reivindicaciones adjuntas, que forman una parte integral de la descripción.

El método de la presente invención difiere de la tecnología de LAMP convencional que se da a conocer en la solicitud de patente europea EP 1020534A y que se representa en el presente documento en la figura 1. El método de la invención permite la amplificación y detección selectivas simultáneas de la sustitución de una sola base en una muestra de ácido nucleico. Además, el método de la presente invención es fácil de realizar, puesto que requiere instrumentación sencilla y los resultados pueden generarse en una reacción en un solo tubo. Por estos motivos, también es menos caro en comparación con los métodos de la técnica anterior.

El método de la invención supera las limitaciones y los inconvenientes de las técnicas de la técnica anterior, dando como resultado una mayor sensibilidad (hasta el 0,01% de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural); es isotérmico y rápido, completándose el diagnóstico en una reacción de una hora. Además, el método de la invención permite evaluar si la cantidad de alelo mutante, tal como por ejemplo el alelo de JAK2 mutante, que está presente en la muestra sometida a prueba es mayor o menor del 50%, proporcionando una indicación de si el sujeto sometido a prueba es heterocigoto u homocigoto para la mutación puntual individual o el SNP de ácido nucleico de interés.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención es un método de detección de la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana dentro de un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, comprendiendo el método las etapas de:

- 1) proporcionar una muestra de ácido nucleico;

2) poner en contacto dicha muestra de ácido nucleico, en condiciones de reacción apropiadas, con una disolución que comprende una mezcla de oligonucleótidos y una ADN polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de hebra en condiciones de hibridación, en el que dicha mezcla de oligonucleótidos consiste en cebadores adecuados para la amplificación isotérmica mediada por bucle de la región de la molécula de ácido nucleico diana que incluye la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse, comprendiendo dichos cebadores:

i. un primer cebador externo F3 y un segundo cebador externo B3;

ii. un primer cebador interno FIP y un segundo cebador interno BIP,

en el que FIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' F2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' F1c y BIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' B2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' B1c,

en el que F2 puede reconocer e hibridarse con una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como F2c y B2 puede reconocer e hibridarse con una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como B2c,

en el que F2c y B2c son regiones diferentes ubicadas en hebras opuestas de la molécula de ácido nucleico diana,

en el que o bien B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual o bien F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, y en el que si B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de F2c o en el sentido de 3' de la secuencia de F2c y en el sentido de 5' de la secuencia de F1c, o

si F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de B2c o en el sentido de 5' de la secuencia de B2c y en el sentido de 3' de la secuencia de B1c;

iii. un cebador extensible mutante de tallo-bucle que comprende:

- una secuencia de bucle central que puede reconocer e hibridarse selectivamente con una región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual, de manera que la secuencia de bucle central puede reconocer e hibridarse con la molécula de ácido nucleico diana sólo si está presente la mutación puntual, y

- una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3' que son complementarias entre sí de manera que se forma un tallo tras hibridación intramolecular,

siendo la afinidad de hibridación de la secuencia de bucle central con la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual mayor que la afinidad de hibridación intramolecular de la secuencia en 5' con la secuencia en 3' de manera que, si está presente la mutación puntual, la secuencia de bucle central se apareará con y amplificará la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual;

iv. un resto no extensible que puede reconocer e hibridarse selectivamente con las moléculas de ácido nucleico de tipo natural;

3) incubar la mezcla resultante a una temperatura constante;

4) detectar una señal indicativa de la amplificación de la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual.

La primera etapa del método implica obtener la muestra de ácido nucleico que va a someterse a prueba, tal como por ejemplo de un paciente que se sospecha que porta la mutación puntual de interés, en una forma o bien heterocigota o bien homocigota.

En una realización preferida, los dos cebadores internos FIP y BIP están diseñados en una región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse de manera que la mutación puntual está ubicada en la región entre la secuencia de F2c y la secuencia de F1c o entre la secuencia de B2c y la secuencia de B1c. En una realización alternativa, la mutación puntual está ubicada en la región estudiada con sonda por B2 o F2, es decir dentro de la secuencia de F2c o dentro de la secuencia de B2c.

En otra realización preferida, la secuencia en el extremo 5' y la secuencia en el extremo 3' del cebador extensible

mutante de tallo-bucle tienen al menos 3 nucleótidos de longitud. El cebador extensible mutante de tallo-bucle puede diseñarse alternativamente como un "cebador extensible mutante autoapareado", o más simplemente como un "cebador extensible autoapareado" (LB o LF).

5 En una realización adicional preferida del método de la invención, el resto no extensible es un ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene preferiblemente al menos 10 nucleótidos de longitud. Los ADN y los ARN consisten respectivamente en una estructura principal de azúcar de desoxirribosa y ribosa, mientras que la estructura principal de los PNA está compuesta por unidades de repetición de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las bases de purina y pirimidina se unen a la estructura principal por enlaces metileno-carbonilo. Los PNA se representan como péptidos, con el extremo N-terminal en la primera posición (izquierda) y el extremo C-terminal a la derecha. Puesto que la estructura principal del PNA no contiene ningún grupo fosfato, la unión entre las hebras de PNA/ADN es más fuerte que entre las hebras de ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática.

15 En la realización más preferida de la invención, el ácido nucleico peptídico (PNA) comprende una secuencia de bases que puede hibridarse con la región de la molécula de ácido nucleico que incluye la supuesta mutación puntual (es decir, que incluye la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse), dando como resultado de ese modo la formación de dos estructuras bicatenarias, una con la molécula de ácido nucleico diana de tipo natural y la otra con la molécula de ácido nucleico diana mutada. La temperatura de fusión de la estructura bicatenaria que resulta de la hibridación del PNA con la molécula de ácido nucleico diana en ausencia de la mutación puntual (es decir, con la secuencia de tipo natural) se designa como  $(T_f) = X$  y la temperatura de fusión de la estructura bicatenaria que resulta de la hibridación del PNA con la molécula de ácido nucleico diana en presencia de la mutación puntual (es decir, con la secuencia mutada) se designa como  $(T_f) = Y$ . Según una realización preferida,  $Y < \text{temperatura de incubación} < \text{o igual a } X$  y  $X$  es al menos 5°C mayor que  $Y$ .

25 En una realización alternativa de la presente invención, el resto no extensible es un cebador no extensible de tipo natural de tallo-bucle, que comprende:

30 - una secuencia de bucle central que puede reconocer e hibridarse selectivamente con una región de la molécula de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse,

35 - una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3', siendo dichas secuencias de extremo 5' y de extremo 3' complementarias entre sí para formar un tallo, de modo que dicha secuencia de bucle central tiene una mayor afinidad de hibridación con la región que comprende la secuencia de tipo natural de la molécula de ácido nucleico que la afinidad de hibridación de la secuencia de extremo 5' con la secuencia de extremo 3', de modo que da como resultado el apareamiento con y el bloqueo de la amplificación de la secuencia de tipo natural. El experto en la técnica es consciente del hecho de que la hibridación entre la secuencia de extremo 5' y la secuencia de extremo 3' es una hibridación intramolecular.

40 En una realización preferida de la presente invención, la ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra en las condiciones de reacción es la Bst polimerasa de fragmento grande; alternativamente, es una de o una combinación de Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago  $\Phi 29$ , fago MS-2, Z-Taq, KOD, fragmento Klenow.

45 En una realización preferida, la temperatura de reacción constante está comprendida entre 62°C y 67°C.

50 En una realización preferida de la presente invención, la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótidos que comprende la mutación puntual se detecta mediante turbidimetría. Alternativamente, la señal indicativa de amplificación de la molécula de nucleótidos que comprende la mutación puntual se detecta mediante fluorescencia o cualquier otro medio adecuado para la detección.

55 En todavía otra realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico diana comprende la región del gen JAK2 humano (n.º de registro de GenBank NG\_009904, SEQ ID NO: 2) que contiene la supuesta sustitución de guanina a timidina en la base 93526 de SEQ ID NO: 2, correspondiente a la posición de nucleótido 1849 desde el codón de iniciación en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GenBank NM\_004972, SEQ ID NO: 1), que a su vez corresponde a la posición 2343 de SEQ ID NO: 1.

60 Preferiblemente, los cebadores externos primero y segundo F3 y B3 están ubicados respectivamente en las regiones de intrón que flanquean al exón 14 del gen JAK2 humano (n.º de registro de GenBank NG\_009904, SEQ ID NO: 2) que contiene la supuesta sustitución de bases G→T en la posición 93526. Más preferiblemente, F3 consiste en una secuencia de nucleótidos que abarca las posiciones 93367-93388 de SEQ ID NO: 2 y B3 consiste en una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la región de nucleótidos entre las posiciones 93561-93582 de SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, los cebadores internos primero y segundo FIP y BIP están diseñados tal como sigue: el cebador FIP consiste en una secuencia de F2 ubicada en la región de intrón en el sentido de 5' del exón 14 de JAK2 (preferiblemente entre las posiciones 93408-93425 de SEQ ID NO: 2) y en una secuencia de F1c que es complementaria a los nucleótidos 93445 a 93470 de SEQ ID NO: 2; el cebador BIP consiste en una secuencia de B2

complementaria a una región que comprende los nucleótidos 93538-93559 de SEQ ID NO: 2, que incluye las primeras dieciocho bases del intrón en el sentido de 3', y en una secuencia de B1c ubicada en la posición 93486-93515 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de bucle central del cebador extensible mutante de tallo-bucle consiste preferiblemente en los nucleótidos 93516-93529 de SEQ ID NO: 2. La secuencia de bases de PNA consiste preferiblemente en los nucleótidos 93518-93534 de SEQ ID NO: 2.

Lo más preferiblemente, los cebadores adecuados para la amplificación isotérmica mediada por bucle, que se emplean para llevar a cabo el método según la presente invención, consisten en las siguientes secuencias:

F3 5'-GCATCTTTATTATGGCAGAGAG-3' (SEQ ID NO: 3);

B3 5'-TGCTCTGAGAAAGGCATTA-3' (SEQ ID NO: 4);

FIP 5'-GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC-3' (SEQ ID NO: 5);

BIP 5'-GCTTTCTACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC-3' (SEQ ID NO: 6);

Cebador extensible mutante de tallo-bucle: 5'-GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC-3' (SEQ ID NO: 8).

En una realización más preferida, el resto no extensible es una molécula de PNA, que tiene preferiblemente la estructura:  $^{NH_2}$ GAGTATGTGTCTGTGGA $^{CONH_2}$  (SEQ ID NO: 9).

El método de la presente invención también es adecuado para evaluar cuantitativamente la cantidad de alelos mutantes (por ejemplo de los alelos mutantes de JAK2 presentes) en una muestra de ácido nucleico, por ejemplo para evaluar si la mutación puntual está en una forma homocigota o heterocigota. Esto se logra comparando cuantitativamente la señal indicativa de amplificación de la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual obtenida a partir de la muestra con dicha señal obtenida a partir de al menos un calibrador. En una realización preferida, el al menos un calibrador consiste en un porcentaje predeterminado (%) de moléculas de ácido nucleico diana mutantes en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, en el que dicho porcentaje predeterminado (%) es preferiblemente de aproximadamente el 10%. Por ejemplo, analizando la eficacia de amplificación de muestras no diluidas y diluidas 1:5 en comparación con 3 calibradores (por ejemplo, el 100%, el 10% y el 1% de plásmido G1849T JAK mutante en un contexto de plásmido de tipo natural), es posible determinar si la cantidad de alelos mutantes en las muestras de prueba es mayor o menor del 50%, lo que es indicativo de homocigosidad o heterocigosidad.

El método de la invención también es adecuado para detectar otras mutaciones génicas responsables de diferentes patologías, tales como KRAS, EGFR, así como para detectar SNP.

Otro aspecto de la presente invención es un conjunto de cebadores para detectar la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural mediante amplificación isotérmica mediada por bucle, comprendiendo el conjunto de cebadores un primer cebador externo F3, un segundo cebador externo B3, un primer cebador interno FIP, un segundo cebador interno BIP y un cebador extensible mutante de tallo-bucle, todos tal como se definieron anteriormente con referencia al método de la invención.

Según una realización preferida, el conjunto de cebadores comprende un primer cebador externo F3 que consiste en SEQ ID NO: 3, un segundo cebador externo B3 que consiste en SEQ ID NO: 4, un primer cebador interno FIP que consiste en SEQ ID NO: 5, un segundo cebador interno BIP que consiste en SEQ ID NO: 6 y un cebador extensible mutante de tallo-bucle que consiste en SEQ ID NO: 8.

Una realización adicional preferida de la invención es un conjunto de cebadores tal como se definió anteriormente que comprende además un resto no extensible que puede hibridarse con las moléculas de ácido nucleico de tipo natural. El resto no extensible es, por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un cebador no extensible de tallo-bucle, tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Se prefiere más un PNA que tiene al menos 10 bases de longitud. El PNA ilustrado en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 9 es la realización más preferida del resto no extensible.

Un aspecto adicional de la presente invención es un kit para detectar la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural mediante amplificación isotérmica mediada por bucle, comprendiendo el kit un conjunto de cebadores tal como se definió anteriormente así como una o más ADN polimerasas que tienen actividad de desplazamiento de hebra. La ADN polimerasa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en Bst polimerasa de fragmento grande, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago  $\Phi$ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, fragmento Klenow, y cualquier combinación de los mismos. La ADN polimerasa más preferida es la Bst polimerasa de fragmento grande.

El kit según la presente invención puede contener componentes convencionales adicionales tales como por ejemplo

uno o más calibradores, medios para detectar y/o cuantificar la amplificación de la molécula de ácido nucleico dianas, así como instrucciones para llevar a cabo el ensayo. La selección y el uso de tales componentes adicionales están muy dentro de las capacidades del experto en la técnica.

- 5 La invención se describe adicionalmente a continuación en el presente documento por medio de ejemplos específicos no limitativos, con referencia a los siguientes dibujos:

Figura 1. Principio de LAMP (técnica anterior)

- 10 La reacción de amplificación se realiza empleando 4 cebadores de oligonucleótidos específicos para 6 regiones diferentes de la secuencia genómica diana. Los cebadores internos se hibridan con secuencias complementarias en la molécula de ácido nucleico diana y se extienden por la ADN polimerasa; el producto de amplificación se desplaza en dos etapas por los cebadores externos (F3, B3) y se conforma como una estructura de tallo-bucle doble (*estructura de partida*) (panel A). La estructura de partida se amplifica simultáneamente desde los extremos 3' libres y por otro cebador interno (panel B). Se sintetizan progresivamente concatámeros de ADN mediante repeticiones invertidas del módulo inicial de manera exponencial (panel C).

Figura 2. Estrategia de "DOBLE ASA" (*dumb bell*) de LAMP

- 20 En la presente configuración de ensayo ilustrada en la figura 2, los oligonucleótidos F1c y B1c contenidos en los cebadores internos FIP y BIP son complementarios a regiones no solapantes del gen JAK2 que acaba y comienza respectivamente una base en el sentido de 5' y una base en el sentido de 3' del nucleótido de interés en la posición 1849 desde el codón de iniciación en la secuencia codificante de JAK2. Además, la base en el extremo 5' de los cebadores FIP y BIP es específica para el nucleótido mutado en la secuencia de JAK2 y ambos cebadores internos  
25 tienen una base apareada erróneamente en la tercera base desde el extremo 3'. Cuando la reacción contiene el alelo diana de tipo natural y se forma una estructura de doble asa, las secuencias de F1c y B1c específicas mutantes no se aparean en el extremo 3', bloqueando cualquier amplificación de la diana adicional. De manera diferente, si el alelo diana mutante está presente en disolución, las secuencias F1c y B1c específicas mutantes se hibridan perfectamente con la región diana de ácido nucleico complementaria y se extienden por la ADN polimerasa.

Figura 3. Estrategia de "extensión de cebador de bucle específico de alelo" de LAMP.

- El nucleótido en el extremo 3' del cebador de bucle específico de mutante es complementario al nucleótido T mutado en la posición 1849 en la secuencia codificante de JAK2. Además, este cebador de bucle contiene una base  
35 apareada erróneamente en la tercera base desde el extremo 3'. Si la reacción contiene la secuencia de JAK2 de tipo natural, el cebador de bucle específico de mutante en el extremo 3' no se aparea con la secuencia diana, dando como resultado la ausencia de amplificación. De manera diferente, si están presentes secuencias de JAK2 mutantes en disolución, el cebador de bucle específico de mutante se hibrida perfectamente con la secuencia diana complementaria y se extiende por la ADN polimerasa.

Figura 4. Estrategia de "cebadores de bucle-tallo" de LAMP

- Conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que comprende los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una doble asa que presenta el supuesto nucleótido T mutado en la región de bucle. Se incluye un  
45 primer cebador de tallo-bucle diseñado para reconocer la base mutada en la estructura de doble asa monocatenaria, junto con un segundo cebador de tallo-bucle modificado complementario a la secuencia de tipo natural de JAK2 y que contiene un extremo 3' no extensible. Cuando la secuencia de JAK2 mutada está presente en la muestra de ácido nucleico (panel A), el cebador de tallo-bucle específico de mutante rompe su estructura interna para aparearse con la secuencia diana y se extiende por la ADN polimerasa. A la inversa, si la secuencia diana de tipo natural está presente en la muestra (panel B), el cebador de tallo-bucle no extensible modificado se hibrida con la secuencia  
50 diana de tipo natural, bloqueando la amplificación de esta secuencia (efecto de "silenciamiento").

Figura 5. Estrategia de "cebador de tallo-bucle específico de mutante con PNA" de LAMP

- Conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que comprende los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una doble asa que presenta el supuesto nucleótido T mutado en la región de bucle. Se incluye un  
55 primer cebador de tallo-bucle diseñado para reconocer la base mutada en la estructura de doble asa monocatenaria, junto con una molécula de PNA. El PNA está diseñado para ser complementario a la región de bucle comprendida entre B2 y B1c y que abarca la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse. Forma un dúplex estable con la secuencia de tipo natural de JAK2, impidiendo por tanto la hibridación y extensión del cebador de tallo-bucle específico de mutante y suprimiendo la amplificación inespecífica de la secuencia de tipo natural (panel B). El PNA no se hibrida con la secuencia de JAK2 mutada debido a la menor afinidad (panel A).

Figura 6. Sensibilidad del ensayo de "DOBLE ASA" de LAMP

- 65 Se realizó la reacción de amplificación con una muestra que contenía plásmido de tipo natural de JAK2 7e3 cps/μl

(cuadrado), con un control no diana y con diluciones en serie de plásmido mutante de JAK2 en agua (desde  $7e3$  hasta  $7e1$  cps/ $\mu$ l, puntos romboidales, y  $7e0$  cps/ $\mu$ l, punto circular). Se sometió a prueba cada muestra por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. En comparación con el plásmido de tipo natural, la secuencia diana mutante se amplifica con mayor eficacia hasta una concentración de muestra de  $7e1$  cps/ $\mu$ l. El presente ensayo muestra linealidad para muestra de plásmido mutante entre  $7e3$  y  $7e1$  cps/ $\mu$ l.

Figura 7. Sensibilidad del ensayo de “cebador de bucle mutante específico de alelo” de LAMP

Se realizó la reacción de amplificación con una muestra que contenía plásmido de tipo natural de JAK2  $7e3$  cps/ $\mu$ l (punto cuadrado), con un control no diana y con diluciones en serie de plásmido mutante de JAK2 en agua (desde  $7e3$  hasta  $7e1$  cps/ $\mu$ l, puntos romboidales). Se sometió a prueba cada muestra por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. En comparación con el plásmido de tipo natural, la secuencia diana mutante se amplifica con mayor eficacia hasta una concentración de muestra de  $7e2$  cps/ $\mu$ l. El presente ensayo muestra linealidad para muestra de plásmido mutante entre  $7e3$  y  $7e1$  cps/ $\mu$ l.

Figura 8. Selectividad del ensayo de “cebador de tallo-bucle” de LAMP

Se realizó la reacción de amplificación con una muestra que contenía plásmido de tipo natural de JAK2  $7e3$  cps/ $\mu$ l (punto cuadrado), con un control no diana y con diluciones en serie de plásmido mutante de JAK2 en plásmido de tipo natural, oscilando entre el 75% y el 1%, 35000 cps de cantidad total de ADN por reacción. Se sometió a prueba cada muestra por triplicado. Las barras de error representan una desviación estándar. En comparación con el plásmido de tipo natural, la secuencia diana mutante se amplifica con mayor eficacia hasta una muestra de dosis del 1% (350 copias de plásmido mutante en 34650 copias de plásmido parental original). El ensayo muestra linealidad entre el 100% y el 1% de muestra de plásmido mutante en un contexto de tipo natural.

Figura 9. Ensayo de “cebador de tallo-bucle con PNA” de LAMP

Rendimiento del ensayo con muestras de plásmido mutante y de tipo natural (35000 cps de cada uno) con y sin PNA. En ausencia de PNA, el plásmido de tipo natural de JAK2 se amplifica inespecíficamente por el cebador de tallo-bucle específico de mutante, con un retraso de 5 minutos con respecto a la secuencia diana mutada. En cambio, cuando se añade el PNA a la mezcla de reacción, el plásmido de tipo natural se amplifica por el cebador de tallo-bucle específico de mutante con un retraso de una hora y se mide un retraso de sólo 5 minutos para la amplificación específica del plásmido mutante de JAK2. El PNA forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria de tipo natural impidiendo la hibridación y extensión del cebador de tallo-bucle específico de mutante provocando de ese modo un desplazamiento de una hora en el tiempo de amplificación de la secuencia de tipo natural.

Figura 10. Selectividad del ensayo de “cebador de tallo-bucle con PNA” de LAMP

Rendimiento del ensayo con muestras de plásmido mutado de JAK2 (350000 cps), muestras de plásmido de tipo natural de JAK2 (350000 cps) y con plásmidos mutados diluidos en serie en un contexto de tipo natural en las siguientes proporciones, el 1, el 0,5, el 0,1, el 0,05 y el 0,01%. Las barras de error corresponden a 1 desviación estándar. No se detectó amplificación para la muestra de tipo natural (350000 cps de plásmido de tipo natural) en una reacción de una hora. Se detecta la amplificación específica de la secuencia diana mutante hasta el 0,01% de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural (35 copias de plásmido mutante tot en 349650 copias de plásmido de tipo natural). El ensayo es lineal hasta una concentración del 0,1% de plásmido mutante (350 copias de plásmido mutante tot en 349650 copias de plásmido de tipo natural).

Figura 11. Reacción de control de LAMP

Conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que incluye los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP. Este método está diseñado para amplificar la secuencia diana de ADN genómico independientemente de la presencia de la mutación específica. Un ensayo de control de este tipo permite evaluar la eficacia de amplificación de los cebadores y la presencia de inhibidores en el tubo de reacción.

Figura 12. Reacción de control de LAMP con muestras de ácido nucleico de tipo natural y mutante de JAK2

La eficacia de amplificación del conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que incluye los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP es comparable para todas las muestras analizadas: el 100% de plásmido de tipo natural de JAK2, el 100%, el 10% y el 1% de plásmido mutante de JAK2. Un retraso o la ausencia de amplificación de la secuencia diana es indicativo de la presencia de inhibidores de reacción o problemas en las condiciones de reacción.

Figura 13. Principio de la estimación de las copias alélicas de JAK2 mutante en una muestra de ácido nucleico.

Para estimar si la cantidad de copias alélicas de JAK2 en una muestra de ácido nucleico es mayor o menor del 50%, se realiza la LAMP modificada con cebador de tallo-bucle específico de mutante y PNA con muestras no diluidas y muestras diluidas 1:5. Si una muestra contiene más del 50% de copias alélicas de JAK2 mutante, el minuto de amplificación umbral de la secuencia diana está comprendido entre el (min)t del 100% de calibrador y el 10% de calibrador para las muestras tanto no diluidas (panel A) como diluidas (panel B). Si una muestra contiene menos del 50% de copias alélicas de JAK2 mutante, el minuto de amplificación umbral de la secuencia diana está comprendido entre el t(min) del 100% de calibrador y el 10% de calibrador para las muestras no diluidas (panel A), y entre el min(t) del 10% de calibrador y el 1% de calibrador para las muestras diluidas (panel B).

10 Figura 14. Estimación de las copias alélicas de JAK2 en muestras de ácido nucleico que contienen más del 50% de secuencias diana mutadas

Se diluyeron 1:5 cuatro muestras de ácido nucleico que contenían más del 50% de plásmido de JAK2 mutante en un contexto de tipo natural (respectivamente el 60%, el 70%, el 80% y el 90%) y se analizaron usando en ensayo de "cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP", junto con tres calibradores que consistían en el 100%, el 10% y el 1% de plásmidos mutantes de JAK2 en un contexto de tipo natural. Para las cuatro muestras, el minuto de amplificación umbral estaba comprendido entre el min(t) del 100% de calibrador y el min(t) del 10% de calibrador.

20 Figura 15. Estimación de las copias alélicas de JAK2 mutante en muestras de ácido nucleico que contienen menos del 50% de secuencias diana mutadas

Se diluyeron 1:5 cuatro muestras de ácido nucleico que contenían el 50% o menos de plásmido de JAK2 mutante en un contexto de tipo natural (respectivamente el 40%, el 30% y el 20%) y se analizaron usando el ensayo de "cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP", junto con tres calibradores que consistían en el 100%, el 10% y el 1% de plásmidos mutantes de JAK2 en un contexto de tipo natural. La amplificación de la muestra del 50% diluida 1:5 se produjo en el mismo minuto de umbral de la muestra del 10% de calibrador. Para las tres muestras restantes, el minuto de amplificación umbral estaba comprendido entre el min(t) del 10% de calibrador y el min(t) del 1% de calibrador.

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1 - Materiales, métodos y resultados de la estrategia de "doble asa" de LAMP modificada para JAK2

35 *Reactivos*

Se proporcionaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) y contenían la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

40 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado "plásmido de tipo natural";

- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado "plásmido mutante".

45 Cebadores: Sintetizados por el proveedor Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) denominados "cebadores":

- GA211 (F3) 5' GTCAAACAACAATTCTTTGTACT 3' (SEQ ID NO: 10);

50 - GA212 (B3) 5' AGCTGTGATCCTGAAACTG 3' (SEQ ID NO: 11)

- GA216 (FIP) 5'AATATACTCCATAATTTAAACCAAATGCTTTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGT 3' (SEQ ID NO: 12)

55 - GA220 (BIP) 5'TTTTGTGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACATAAACAAAAACAGATGCTCTGA 3' (SEQ ID NO: 13)

- GA221 (LF) 5' GTGAGAAAGCTTGCTCATCAT 3' (SEQ ID NO: 14)

- GA222 (LB) 5' AGGCTTTCTAATGCCTTTC 3' (SEQ ID NO: 15)

60 Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, DMSO al 5% "tampón 5x"

mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "dNTP"

65 Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/ul (New England Biolabs), "Polimerasa"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "ddw"

*Procedimiento*

5 Preparación de las muestras

Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebadores de bucle 0,8 μM (LF y LB), disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 17 muestras, que comprenden 3 de control negativo (plásmido de tipo natural 7e3 cps/μl), 12 de control positivo (3 muestras de plásmido mutante 7e3 cps/μl, 3 muestras de plásmido mutante 7e2 cps/μl, 3 muestras de plásmido mutante 7e1 cps/μl, 3 muestras de plásmido mutante 7e0 cps/μl), 1 control no diana.

15 Tabla 1 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que va a añadirse (5 μl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e2 cps/μl	Plásmido mutante 7e1 cps/μl	Plásmido mutante 7e0 cps/μl	
GA 211 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA212 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA 221 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA 221 100μM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA 216 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA 220 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Buffer LAMP 5x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 μl	13,18	13,18	13,18	13,18	13,18	13,18

Dispensar 20 μl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

20 Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones de la diana*") a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/μl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/μl en Tris 10 mM, luego diluir en serie hasta 7e3 cps/μl, 7e2 cps/μl, 7e1 cps/μl y 7e0 cps/μl en Tris 10 mM. Diluir el plásmido de tipo natural hasta  $7 \cdot 10^3$  copias/μl en Tris 10 mM.

25 Añadir 5 μl de las diluciones de la diana a la tiras, por triplicado. Añadir 5 μl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la muestra más concentrada. Cerrar todos los tubos.

30 Reacción

La reacción sigue el esquema del método de la figura 1 y 2.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez, con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 66°C durante 1 hora.

35 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

Análisis de datos

40 Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. (unidades arbitrarias de absorbancia) para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/μl.

Resultados

La estrategia de “doble asa de JAK2 de LAMP” se basa en el método de LAMP de Eiken para la detección de SNP (descrito en el documento EP 1231281, 20, 21, 22, así como en [http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps\\_anim.html](http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps_anim.html)).

5 En la presente configuración de ensayo ilustrada en la figura 2, los oligonucleótidos F1c y B1c contenidos en los cebadores internos FIP y BIP son complementarios a secuencias no solapantes del gen JAK2 que acaba y comienza respectivamente una base en el sentido de 5' y una base en el sentido de 3' del nucleótido de interés en la posición 1849 desde el codón de iniciación en la secuencia codificante de JAK2. Además, la base en el extremo 5' de los  
10 cebadores FIP y BIP es específica para el nucleótido de T mutado en la secuencia de JAK2 y ambos cebadores internos tienen una base apareada erróneamente en la tercera base desde el extremo 3'. Cuando la reacción contiene el alelo diana de tipo natural y se forma una estructura de doble asa, las secuencias de F1c y B1c específicas de mutante no se aparean en el extremo 3', bloqueando cualquier amplificación adicional. De manera diferente, si el alelo diana mutante está presente en disolución, las secuencias de F1c y B1c específicas de mutante  
15 se hibridan perfectamente con la región diana de ácido nucleico complementaria y se extienden por la ADN polimerasa.

Tal como se muestra en la figura 6, se detectaron concentraciones de plásmido mutante decrecientes mediante el ensayo de LAMP que oscilaban entre 7e3 cps/μl y 7e0 cps/μl (35 copias de plásmido mutante tot). A bajas  
20 concentraciones de la secuencia diana de ácido nucleico, esta configuración de ensayo de LAMP podría no discriminar entre plásmidos mutantes y de tipo natural que se amplifican en efecto a una concentración de 7e3 cps/μl. Puesto que se requiere un valor de selectividad menor del 1% con el fin de superar las limitaciones de los métodos de ensayo descritos anteriormente en la bibliografía, no se obtuvo una ventaja clara con el presente enfoque.

25 EJEMPLO 2 - Materiales, métodos y resultados de la estrategia de “extensión de cebador de bucle específico de alelo” de LAMP modificada para JAK2

*Reactivos*

30 Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

35 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado “*plásmido de tipo natural*”;

- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado “*plásmido mutante*”.

40 Cebadores: Sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados “*cebadores*”:

- JAKR5 (F3) 5' TCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAG 3' (SEQ ID NO: 16)

45 - JAKR2 (B3) 5' AAGGCATTAGAAAGCCTGTAGT 3' (SEQ ID NO: 17)

- JAKR7 (FIP) 5'ACAAAGAATTGTTGTTTACTGTTGTCCATTGCATCTTTATTATGGCAGAGAGAA3' (SEQ ID NO: 18)

50 - JAKR8 (BIP) 5' AGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGTTACTTACTCTCGTCTCCACAGA 3' (SEQ ID NO: 19)

- JAKR9 (LB) 5' AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTAGGTT 3' (SEQ ID NO: 20).

La base subrayada corresponde a un nucleótido apareado erróneamente; la base en negrita corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG de la secuencia codificante de JAK2.

55 Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, “*tampón 5x*”

mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), “*dNTP*”

60 Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/ul (New England Biolabs), “*Polimerasa*”

Agua apirógena estéril (SALF Spa), “*ddw*”

65 *Procedimiento*

Preparación de las muestras

Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.

5 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 µM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 µM (FIP y BIP), cebador de bucle 0,8 µM (LB), disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 µl de mezcla de reacción + 5 µl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 14  
10 muestras, que comprenden 3 de controles negativos (plásmido de tipo natural 7e3 cps/µl), 9 de control positivo (3 muestras de plásmido mutante 7e3 cps/µl, 3 muestras de plásmido mutante 7e2 cps/µl, 3 muestras de plásmido mutante 7e1 cps/µl), 1 control no diana.

Tabla 2- Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que va a añadirse (5 µl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e2 cps/µl	Plásmido mutante 7e1 cps/µl	Plásmido mutante 7e0 cps/µl	
JAKR5 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
JAKR2 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
JAKR7 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
JAKR8 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
JAKR9 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/µl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 µl	14	14	14	14	14	14

Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

20 Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones de la diana*") a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie hasta 7e3 cps/µl, 7e2 cps/µl, 7e1 cps/µl en Tris 10 mM. Diluir el plásmido de tipo natural hasta  $7 \cdot 10^3$  copias/µl en Tris 10 mM. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a la  
25 tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

Reacción

La reacción sigue el esquema del método de la figura 3.

30 Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

35 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

Análisis de datos

40 Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/µl.

Resultados

45 El presente enfoque consiste en la amplificación selectiva de una secuencia mutante usando un cebador de bucle específico de mutante (figura 3). Se diseñó un conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que

incluía los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una estructura de doble asa que presentaba la supuesta mutación en la región de bucle comprendida entre B2 y B1c. Además, se diseñó un cebador de bucle que presentaba la última base en el extremo 3' complementaria al nucleótido de T mutado en la posición 1849 de la secuencia codificante de JAK2 y una base apareada erróneamente en la tercera base desde el extremo 3'.

5 Si la reacción contiene la secuencia diana de tipo natural, el extremo 3' del cebador de bucle específico de mutante no se aparea con el nucleótido complementario, dando como resultado por tanto ausencia de amplificación. De manera diferente, si están presentes secuencias mutantes de JAK2 en disolución, el cebador de bucle específico de mutante se hibrida perfectamente con la secuencia complementaria y se extiende por la ADN polimerasa.

10 Se realizó la evaluación del ensayo con muestras de plásmido mutante a concentraciones que oscilaban entre 7e3 cps/ $\mu$ l y 7e1 cps/ $\mu$ l (35000 y 350 copias de plásmido mutante tot) y con una muestra de tipo natural que contenía plásmido 7e3 cps/ $\mu$ l, todas las muestras sometidas a prueba por triplicado. Con el presente método, se detectó amplificación inespecífica para la muestra de plásmido de tipo natural a 7e3 cps/ $\mu$ l y no pudieron discriminarse  
15 muestras mutantes y de tipo natural a concentraciones de 7e1 cps/ $\mu$ l. Puesto que se requiere un valor de selectividad menor del 1% con el fin de superar las limitaciones de los métodos de ensayo descritos anteriormente en la bibliografía, no se obtuvo una ventaja clara con el presente enfoque (figura 7).

20 EJEMPLO 3 - Materiales, métodos y resultados de de la estrategia de LAMP de "cebador de tallo-bucle" modificada para JAK2

*Reactivos*

25 Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido de tipo natural*";

30 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido mutante*".

Cebadores: Sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

35 - GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

- GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

40 - GA234 (BIP) 5' GCTTCTCACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

GA235 (LF) 5'GTCTCCACTGGAGTATGTTCTGTGGAGAddC3' (SEQ ID NO: 7)

45 - la base subrayada corresponde al nucleótido de tipo natural en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

- ddC significa didesoxi-citosina no extensible.

50 - GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

- la base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

55 Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, "*tampón 5x*"

mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

60 Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/ $\mu$ l (New England Biolabs), "*Polimerasa*"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "*ddw*"

*Procedimiento*

65 Preparación de las muestras

Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.

- 5 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 µM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 µM (FIP y BIP), cebadores de bucle autoapareados ambos 0,8 µM (LB y LF no extensibles), disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 µl de mezcla de reacción + 5 µl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 26 muestras, que comprenden 3 de controles negativos (el 100% de plásmido de tipo natural, 7e3 cps/µl), 21 de control positivo (3 muestras del 100% de plásmido mutante (7e3 cps/µl), 3 muestras del 75% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 50% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 25% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 10% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 5% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural) y un control no diana.

Tabla 3 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15
Diana que va a añadirse (5 µl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 5,25e3 cps/µl, plásmido de tipo natural 1,75e3 cps/µl	Plásmido mutante 3,5e3 cps/µl plásmido de tipo natural 3,5e3 cps/µl	Plásmido mutante 1,75e3 cps/µl plásmido de tipo natural 5,25e3 cps/µl
GA231 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA235 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/µl	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 µl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

- 20 Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

- 25 Prepare diluciones en serie de la diana (*"diluciones de la diana"*) a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie el plásmido mutante en plásmido de tipo natural para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural: el 75%, el 50%, el 25%, el 10%, el 5%, el 1% (cantidad total por tubo, 7e3 cps/µl).

- 30 Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a la tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

Reacción

- 35 La reacción sigue el esquema del método de la figura 4.  
Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez, con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

- 40 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

Análisis de datos

Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/ $\mu$ l.

5

### Resultados

El presente enfoque consiste en la amplificación selectiva de una secuencia mutante basándose en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado la hibridación selectiva de tal cebador de bucle con la doble asa formada a partir de la secuencia mutante (figura 4). Se diseñó un conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que incluía los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una estructura de doble asa que presentaba la supuesta mutación en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. No se detectaron diferencias importantes cuando se realizaron tales experimentos con secuencias alternativas que contenían el supuesto nucleótido mutado en la región de bucle dentro de B2 o entre B2 y B1c. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'. En consecuencia, este cebador de bucle especial forma una estructura en horquilla intramolecular que está en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

Cuando la secuencia de JAK2 mutada está presente en la muestra, tal cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para hibridarse con la secuencia diana complementaria, según el equilibrio termodinámico ( $T_f$  entre el cebador y la diana específica = 65°C). El cebador de bucle hibridado con la diana mutada específica se extiende entonces por la polimerasa y la amplificación puede avanzar adicionalmente. Como característica adicional, el cebador de bucle específico para la mutación G→T de JAK2 presenta una  $T_f$  con la secuencia diana de tipo natural (59°C) menor que la estructura en horquilla intramolecular (65°C). Por tanto, en una muestra que contiene la secuencia de tipo natural de JAK2, tal diferencia en los valores de  $T_f$  da como resultado el autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura en horquilla en vez de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares.

Para limitar la competencia de este cebador de bucle por las secuencias de tipo natural que probablemente están presentes en gran exceso en la muestra clínica, se incluyó en la configuración de reacción un segundo cebador de bucle con estructura análoga y que contenía una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de tipo natural de JAK2, es decir con una base de G en la posición 1849 desde el codón de iniciación (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

El extremo 3' de este cebador de bucle "competidor" se hace no extensible mediante una modificación (3' didesoxi). La tarea de este competidor es "silenciar" la secuencia de tipo natural, permitiendo por tanto que el cebador mutante específico encuentre su diana.

Cuando el cebador "competidor" reconoce la secuencia de tipo natural complementaria, rompe su estructura intramolecular para hibridarse con la diana de tipo natural, según la mayor afinidad ( $T_f$  del dúplex formado por la diana de tipo natural y el cebador de bucle modificado de tipo natural = 67°C). El cebador de bucle hibridado con la diana de tipo natural no es extensible, dando como resultado ausencia de amplificación de las secuencias de tipo natural. Puesto que la reacción se realiza a temperatura constante, el cebador de tallo-bucle específico de tipo natural permanece unido a las secuencias de tipo natural impidiendo por tanto la hibridación inespecífica del cebador de bucle mutante.

En contraposición al cebador de bucle específico de mutante, el cebador "competidor" presenta una  $T_f$  con la secuencia diana mutante (62°C) menor que la estructura en horquilla intramolecular formada consigo mismo (65°C). Por tanto, las mayores fuerzas intramoleculares en comparación con las intermoleculares provocan el autosequestro del cebador de tallo-bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura en horquilla en vez de formar un dúplex con la secuencia diana mutante.

La selectividad del presente ensayo se evaluó realizando la amplificación de la secuencia diana en diluciones en serie de plásmido mutante en un contexto de tipo natural (figura 8). La selectividad lograda es significativamente menor del 1% (350 copias de plásmido mutante tot en 34650 copias de plásmido de tipo natural) lo que indica un mayor rendimiento que los ensayos descritos anteriormente en la bibliografía.

Se detecta linealidad del ensayo entre el 100% de plásmido mutante (35000 cps) y el 1% de mutante en el 99% de plásmidos de tipo natural (350 copias de plásmido mutante tot en 34650 copias de plásmido de tipo natural), permitiendo por tanto la detección y cuantificación de un bajo porcentaje de secuencias mutantes en una gran cantidad de plásmidos de tipo natural. Por tanto, se ha logrado una mejora significativa con tal enfoque de LAMP implementado.

EJEMPLO 4 - Materiales, métodos y resultados de la estrategia de "cebador de tallo-bucle con PNA" de LAMP modificada para JAK2

65

*Reactivos*

Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

- 5 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido de tipo natural*";
- 10 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido mutante*".

Cebadores: Sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

- 15 - GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)
- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)
- GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)
- 20 - GA234 (BIP) 5'GCTTTCTCACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)
- GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

La base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

PNA: Sintetizado por Eurogentec, denominado "*PNA*" GM43 <sup>NH<sub>2</sub></sup>GAGTATGTTCTGTGGA<sup>COOH</sup> (SEQ ID NO: 9.)

30 La fase subrayada corresponde al nucleótido de tipo natural en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, "*tampón 5x*"

35 mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/μl (New England Biolabs), "*Polimerasa*"

Agua apirógena estéril (SALF Spa), "*ddw*"

40

*Procedimiento*

Preparación de las muestras

45 Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.

50 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebador de bucle autoapareado 0,8 μM específico para JAK2 mutante (LB), PNA 0,8 μM, disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 23 muestras, que comprenden 3 de controles negativos (el 100% de plásmido de tipo natural, 7e4 cps/μl), 18 de control positivo (3 muestras del 100% de plásmido mutante, 3 muestras del 1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,5% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,05% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,01% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural (cantidad total de ADN de 7e4 cps/μl)) y un control no diana.

60

## ES 2 535 178 T3

Tabla 4 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que va a añadirse (5 µl)	Plásmido de tipo natural 7e4 cps/µl	Plásmido mutante 7e4 cps/µl	Plásmido mutante 7e2 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,93e4 cps/µl	Plásmido mutante 3,5e2 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,65e4 cps/µl	Plásmido mutante 7e1 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,993e4 cps/µl	Plásmido mutante 3,5e1 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,9965e4 cps/µl
GA231 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
PNA 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/µl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 µl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

- 5 Preparar diluciones en serie de la diana ("*diluciones de la diana*") a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie el plásmido mutante en plásmido de tipo natural para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural: el 1%, el 0,5%, el 0,1%, el 0,05%, el 0,01% (cantidad total por tubo, 7e4 cps/µl).

- 10 Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

### Reacción

- 15 La reacción sigue el esquema del método de la figura 5.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

- 20 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

### Análisis de datos

- 25 Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/µl.

### Resultados

- 35 Este enfoque consiste en la amplificación selectiva de una secuencia mutante basándose en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado la hibridación selectiva de tal cebador de bucle con la doble asa formada a partir de la secuencia mutante (figura 5). Se diseñó un conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que incluía los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una doble asa que presentaba el supuesto nucleótido mutado en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. No se detectaron diferencias importantes cuando se realizaron tales experimentos con secuencias alternativas que contenían el supuesto nucleótido mutado en la región de bucle dentro de B2 o entre B2 y B1c. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'. En consecuencia, este cebador de bucle especial forma una estructura en horquilla intramolecular que está en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

Cuando la secuencia de JAK2 mutada está presente en la muestra, tal cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para hibridarse con la secuencia diana complementaria, según el equilibrio termodinámico ( $T_f$  entre el cebador y la diana específica =  $65^\circ\text{C}$ ). El cebador de bucle hibridado con la diana mutada específica se extiende entonces por la polimerasa y la amplificación puede avanzar adicionalmente. Como característica adicional, el cebador de bucle específico para la mutación G→T de JAK2 presenta una  $T_f$  con la secuencia diana de tipo natural ( $59^\circ\text{C}$ ) menor que la estructura en horquilla intramolecular ( $65^\circ\text{C}$ ). Por tanto, en una muestra que contiene la secuencia de tipo natural de JAK2, tal diferencia en los valores de  $T_f$  da como resultado el autosequestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura en horquilla en vez de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares.

Para aumentar adicionalmente la capacidad de discriminación del sistema de LAMP basado en cebador de tallo-bucle selectivo, se añadió a la mezcla de reacción un ácido nucleico peptídico (PNA).

Los PNA son oligonucleótidos no extensibles y no desplazables en los que la estructura principal de ribosa-fosfato se reemplaza por unidades de (2-aminoetil)-glicina unidas mediante enlaces amida. Cada apareamiento de bases ADN/PNA contribuye a la estabilidad de la estructura de dúplex más que un apareamiento de bases regular ADN/ADN. Por tanto un solo apareamiento erróneo en un dúplex de PNA/ADN da como resultado una diferencia significativa en la  $T_f$ . Una sonda de PNA completamente complementaria a la secuencia de tipo natural del gen JAK2 impide la hibridación y extensión del cebador de tallo-bucle específico de mutante, suprimiendo la amplificación inespecífica de la secuencia de tipo natural. En presencia de un solo apareamiento erróneo, el PNA no inhibe la hibridación del cebador de bucle, lo que conduce a amplificación. Por tanto, puede usarse PNA para bloquear selectivamente la secuencia de tipo natural presente en la muestra.

El PNA está diseñado para que sea complementario a la región de bucle comprendida entre B2 y B1c que presenta el nucleótido de G de tipo natural. Forma un dúplex estable sólo con la secuencia complementaria de tipo natural ( $T_f$  de  $65,7^\circ\text{C}$ ), impidiendo la hibridación y extensión del cebador de tallo-bucle específico de mutante y por tanto suprimiendo la amplificación de la secuencia de tipo natural. El PNA no se hibrida con la secuencia de JAK2 mutada de menor afinidad ( $T_f = 56^\circ\text{C}$ ).

Se evaluó la eficacia del PNA como pinza de amplificación de tipo natural comparando el rendimiento de las reacciones de amplificación llevadas a cabo con y sin el PNA en muestras de plásmidos mutantes y de tipo natural  $7e3$  cps/ul (figura 9). El análisis de las curvas de amplificación reveló que la presencia del PNA condujo a un retraso de una hora en la amplificación inespecífica del plásmido de tipo natural por el cebador de tallo-bucle específico de mutante y a un retraso de 5 minutos en la amplificación específica del plásmido mutante. A la inversa, en ausencia de PNA la amplificación no específica del plásmido de tipo natural por el cebador de tallo-bucle específico de mutante se produjo con un retraso de sólo 5 minutos en comparación con la secuencia diana mutada específica. El retraso observado en la amplificación de tipo natural se explica por la formación de un dúplex estable entre el PNA y la secuencia complementaria de tipo natural, impidiendo por tanto la hibridación inespecífica y extensión del cebador de tallo-bucle específico de mutante.

Para determinar la selectividad de este formato de ensayo de LAMP, se realizaron reacciones de amplificación con diluciones en serie de plásmido mutante en un contexto de tipo natural (figura 10). Puesto que la selectividad lograda es menor del 0,01% (35 copias de plásmido mutante tot en 34965 copias de plásmido de tipo natural), el presente enfoque muestra una mayor selectividad que los ensayos descritos en la técnica anterior, aproximadamente 3 logaritmos mayor con respecto a la secuenciación directa, RFLP y pirosecuenciación y aproximadamente 2 logaritmos con respecto a ARMS, técnicas en tiempo real y análisis de curvas de fusión de ADN.

En resumen, el presente formato de ensayo de LAMP representa una mejora significativa con respecto a las estrategias descritas anteriormente en este documento y los métodos de detección ilustrados en la bibliografía: i) la amplificación inespecífica de la muestra de tipo natural (350000 cps de plásmido de tipo natural) se retrasa aproximadamente una hora, ii) la amplificación específica de la diana mutante se detecta hasta el 0,01% de secuencias mutantes en el tipo natural (35 copias de plásmido mutante tot en 349965 copias de plásmido de tipo natural), iii) la selectividad del ensayo es aproximadamente 2 logaritmos mayor que la selectividad de otros enfoques descritos en la bibliografía, iv) la linealidad del ensayo es hasta el 0,1% de secuencias mutantes (350 copias de plásmido mutante tot en 349650 copias de plásmido de tipo natural), permitiendo por tanto la detección y cuantificación de un bajo porcentaje de alelos mutantes en un gran exceso de ADN de tipo natural.

#### EJEMPLO 5 – Ensayo de “cebador de tallo-bucle con PNA” de LAMP en muestras clínicas: comparación con ARMS

Se analizaron un total de 29 muestras de ADN extraído de pacientes en el Ospedali Riuniti di Bergamo usando la estrategia de “cebador de tallo-bucle con PNA” de LAMP para JAK2, tal como se describe en el ejemplo 4. Se compararon los resultados obtenidos con los datos obtenidos en el Hospital usando la tecnología de ARMS. El ARMS se aprovecha del hecho de que los cebadores de oligonucleótidos deben aparearse perfectamente en sus extremos 3' para que una ADN polimerasa extienda estos cebadores durante la PCR. Diseñando cebadores de oligonucleótidos que coinciden en el extremo 3' con la mutación puntual de JAK2 específica, el ARMS puede distinguir entre alelos de tipo natural y mutantes.

Tal como se muestra en la tabla 5, el ensayo de LAMP detectó como positivas todas las muestras diagnosticadas previamente como tales mediante ARMS. De las 15 muestras que resultaron negativas mediante ARMS, 11 se diagnosticaron como negativas mediante LAMP y 4 como positivas bajas. Para excluir que estas 4 muestras discordantes fuesen falsos positivos en el ensayo de LAMP y confirmar que el diagnóstico de mutación se debía a la mayor selectividad del método de LAMP implementado, se sometieron a prueba las muestras discordantes usando un tercer ensayo. Tal ensayo se basaba en la amplificación de la región de JAK2 de interés mediante PCR en presencia de la molécula de PNA complementaria a la diana de tipo natural con el fin de enriquecer la base mutada, si estaba presente, mediante la supresión de la amplificación de la secuencia de tipo natural por medio de pinzamiento con PNA. Si se logra un enriquecimiento en la muestra del 20% del alelo mutante, puede detectarse la secuencia alterada mediante un enfoque de secuenciación directa. Los cebadores (GA231 directo y GA232 inverso) y el PNA eran tal como se describieron anteriormente (ejemplo 4). Se realizó la amplificación en tampón de reacción 1x que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 200 μM, cebadores directo e inverso 500 nM, PNA 1,5 M y 0,025 U de Taq Gold en un volumen final de 45 μl. Se añadió un volumen de 5 μl de secuencia diana (20 ng/μl) a la mezcla de reacción y se incubó la disolución en un termociclador, siguiendo un programa térmico que consistía en 10 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, ciclos de 40 s a 62°C, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C y acabando con 10 min a 72°C para la extensión final. Se sometieron a prueba por duplicado las cuatro muestras clínicas discordantes, una muestra de control no diana y controles positivo y negativo que contenían respectivamente la diana de plásmido mutante y de tipo natural. Tras la reacción, se separaron los productos de amplificación en un gel de agarosa y se visualizaron usando EtBr. No se detectó amplificación para el control no diana; era visible una banda débil en el gel de agarosa para el control negativo y una banda intensa para el control positivo. Se analizaron posteriormente los productos de PCR de las cuatro muestras clínicas por medio de secuenciación automática, mostrando todos un doble pico en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG (n.º de registro de GeneBank NM\_004972), correspondiente respectivamente a la base de guanina (de tipo natural) y a la base de timina (mutada). Estos resultados confirmaron que se diagnosticó correctamente que las cuatro muestras discordantes portaban la sustitución de bases G→T mediante LAMP, mientras que ARMS las detectaba como falsos negativos.

Tabla 5

muestra	ARMS	Ensayo de cebador de bucle autoapareado con PNA de LAMP
PIGI	-	+ (bajo)
PEVI	-	-
ACGI	+	+
BEMA	+	+
BILU	+	+
PAAN	-	+ (bajo)
BOMA	-	-
OLIN	-	-
PALO	+	+
BOED	+	+
SAGE	+	+
BAGI	+	+
FEGI	+	+
BEAL	+	+
TALU	+	+
CAPI	+	+
SAGI	+	+
SAVGI	+	+
PECA	+	+
SCLU	-	-
BILU2	-	+ (bajo)
NAGI	-	-
MAST	-	-

COSA	-	-
GUAL	-	-
COCL	-	-
PEMG	-	-
SABA	-	+ (bajo)
ANPI	-	-

EJEMPLO 6 - "Estrategia de cebador de tallo-bucle" de LAMP modificada para JAK2 fluorescente

*Reactivos*

5 Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

10 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido de tipo natural*";

- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado "*plásmido mutante*".

15 Cebadores: Sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados "*cebadores*":

- GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

20 - GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

- GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

- GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

25 GA236 (LB) 5' TAMRA-TGTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

30 - La base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG de la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972). La base de timina en negrita en el extremo 5' no tiene una base complementaria en la secuencia diana. Se ha añadido para separar el fluoróforo de la base de guanina en el sentido de 3', que tiene un efecto de extinción.

- GA235 (LF) 5'-5'GTCTCCACTGGAGTATGTGTCTGTGGAGAddC3' (SEQ ID NO: 7)

35 La base subrayada corresponde al nucleótido de tipo natural en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG de la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972); ddC representa didesoxi-citosina no extensible.

40 Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, "*tampón 5x*"

mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), "*dNTP*"

Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/μl (New England Biolabs), "*Polimerasa*"

45 Agua apirógena estéril (SALF Spa), "*ddw*"

*Procedimiento*

Preparación de las muestras

50 Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.

55 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebador de bucle autoapareado fluorescente 0,8 μM específico para JAK2 mutante (LB), cebador de bucle no extensible autoapareado 0,8 μM para JAK2 de tipo natural (LF), disolución tampón 1x, mezcla de dNTP

1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 µl de mezcla de reacción + 5 µl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 23 muestras, que comprenden 3 de controles negativos (el 100% de plásmido de tipo natural, 7e3 cps/µl), 18 de control positivo (3 muestras del 100% de plásmido mutante, 3 muestras del 1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,5% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,05% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 0,01% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, cantidad total de ADN de 7e3 cps/µl) y un control no diana.

5

10

Tabla 6 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Diana que va a añadirse (5 µl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e1 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,93e3 cps/µl	Plásmido mutante 3,5e1 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,965e3 cps/µl	Plásmido mutante 7e0 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,993e3 cps/µl	Plásmido mutante 3,5e0 cps/µl, plásmido de tipo natural 6,996e3 cps/µl
GA231 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 µM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 µM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
GA235 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GA236 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/µl	1	1	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 µl	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8

Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

15

Preparar diluciones en serie de la diana (*"diluciones de la diana"*) a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie el plásmido mutante en plásmido de tipo natural para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural: el 1%, el 0,5%, el 0,1%, el 0,05%, el 0,01% (cantidad total por tubo, 7e3 cps/µl).

20

Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

25

### Reacción

La reacción sigue el esquema del método de la figura 4.

30

Programar el instrumento en tiempo real para incubación a temperatura constante con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora. Programar el instrumento en tiempo real con el fin de obtener una lectura de fluorescencia por minuto.

Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

35

### Análisis de datos

El cebador de bucle autoapareado fluorescente en la reacción produce una señal fluorescente una vez que se excita mediante una emisión de luz de longitud de onda apropiada. Cuando avanza la reacción de LAMP, el cebador de bucle autoapareado fluorescente se hibrida con la secuencia diana complementaria que se incorpora en consecuencia en los productos de amplificación. El cebador de bucle autoapareado fluorescente está diseñado para

40

ser complementario a una secuencia que contiene al menos un nucleótido de guanina próximo al extremo 5'. La base de guanina puede absorber la longitud de onda emitida por el fluoróforo (TAMRA en este caso), provocando la extinción de la señal fluorescente. En este caso, la detección de la amplificación de la secuencia diana durante la reacción de LAMP se basa en la medición de la disminución de la señal de fluorescencia con el fin de hallar un tiempo umbral para cada muestra en análisis. El tiempo umbral es el minuto en el que la señal de fluorescencia de la reacción alcanza el 50% de extinción. Para cada muestra, el tiempo umbral se correlaciona con el logaritmo de copias de ADN/ $\mu$ l.

### Resultados

El presente enfoque consiste en la amplificación selectiva de una secuencia mutante basándose en un diseño de cebador de bucle particular que da como resultado la hibridación selectiva de tal cebador de bucle con la doble asa formada a partir de la secuencia mutante (figura 4). Se diseñó un conjunto de cebadores universales (insensibles a mutantes) que incluía los oligonucleótidos F3, B3, FIP y BIP para obtener una estructura de doble asa que presentaba la supuesta mutación en la región de bucle comprendida entre B1 y B2. No se detectaron diferencias importantes cuando se realizaron tales experimentos con secuencias alternativas que contenían el supuesto nucleótido mutado en la región de bucle dentro de B2 o entre B2 y B1c. Se incluyó en el conjunto de cebadores un cebador de bucle particular que presentaba una región de secuencia de 8 bases en su extremo 5' complementaria a su propia secuencia en el extremo 3'. En consecuencia, este cebador de bucle especial forma una estructura en horquilla intramolecular que está en equilibrio con su forma abierta a la temperatura de reacción (65°C).

Cuando la secuencia de JAK2 mutada está presente en la muestra, tal cebador de bucle modificado rompe su estructura interna para hibridarse con la secuencia diana complementaria, según el equilibrio termodinámico ( $T_f$  entre el cebador y la diana específica = 65°C). El cebador de bucle hibridado con la diana mutada específica se extiende entonces por la polimerasa y la amplificación puede avanzar adicionalmente. Como característica adicional, el cebador de bucle específico para la mutación G→T de JAK2 presenta una  $T_f$  con la secuencia diana de tipo natural (59°C) menor que la estructura en horquilla intramolecular (65°C). Por tanto, en una muestra que contiene la secuencia de tipo natural de JAK2, tal diferencia en los valores de  $T_f$  da como resultado el autosecuestro del cebador de tallo-bucle específico de mutante que prefiere plegarse en la estructura en horquilla en vez de formar un dúplex con la diana inespecífica, puesto que las fuerzas intramoleculares son mayores que las intermoleculares.

Para limitar la competencia de este cebador de bucle por las secuencias de tipo natural que probablemente están presentes en gran exceso en la muestra clínica, se incluyó en la configuración de reacción un segundo cebador de bucle con estructura análoga y que contenía una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de tipo natural de JAK2, es decir con una base de G en la posición 1849 desde el codón de iniciación (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

El extremo 3' de este cebador de bucle "competidor" se hace no extensible mediante una modificación (3' didesoxi). La tarea de este competidor es "silenciar" la secuencia de tipo natural, permitiendo por tanto que el cebador mutante específico encuentre su diana.

Cuando el cebador "competidor" reconoce la secuencia de tipo natural específica, rompe su estructura intramolecular para hibridarse con la diana de tipo natural, según la mayor afinidad ( $T_f$  del dúplex formado por la diana de tipo natural y el cebador de tallo-bucle específico de tipo natural = 67°C). El cebador de tallo-bucle hibridado con la diana de tipo natural no es extensible, dando como resultado ausencia de amplificación de las secuencias de tipo natural. Puesto que la reacción se realiza a temperatura constante, el cebador de tallo-bucle específico de tipo natural permanece unido a las secuencias alélicas de tipo natural impidiendo por tanto la hibridación inespecífica del cebador de bucle mutante.

En contraposición al cebador de tallo-bucle específico de mutante, el cebador "competidor" presenta una  $T_f$  con la secuencia diana mutante (62°C) menor que la estructura en horquilla intramolecular formada consigo mismo (65°C). Por tanto, las mayores fuerzas intramoleculares en comparación con las intermoleculares provocan el autosecuestro del cebador de bucle modificado que prefiere plegarse en la estructura en horquilla en vez de formar un dúplex con la secuencia diana mutante.

Para seguir la reacción en un instrumento en tiempo real, se marcó el extremo 5' del cebador de tallo-bucle específico de mutante con un colorante de FAM. Para evitar la unión del fluoróforo a la base de guanina presente en el extremo 5' del cebador de bucle modificado, que tiene un efecto de extinción, se añadió una base de timina al extremo del oligonucleótido. El cebador marcado modificado, cuando está presente en disolución, emite una señal fluorescente si se excita a la luz de longitud de onda apropiada. Cuando comienza la reacción de LAMP y avanza, el cebador de tallo-bucle fluorescente se incorpora en los productos de amplificación. Las bases de guanina presentes en la secuencia de nucleótidos complementaria pueden absorber la longitud de onda emitida por el fluoróforo, provocando una extinción detectable de la señal fluorescente en tiempo real. Por tanto, la acumulación de productos de amplificación puede monitorizarse a lo largo de toda la reacción de LAMP midiendo la disminución en la señal de fluorescencia provocada por este "efecto de extinción".

EJEMPLO 7 - Reacción de LAMP de control

*Reactivos*

- 5 Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:
- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado “*plásmido de tipo natural*”;
  - 10 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado “*plásmido mutante*”.
- Cebadores: Sintetizados por Eurofins MWG Operon, denominados “*cebadores*”:
- 15 - GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)
  - GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3'(SEQ ID NO: 4)
  - 20 - GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)
  - GA234 (BIP) 5'GCTTTCTCACAAGCATTGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)
- Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, “*tampón 5x*”
- 25 mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), “*dNTP*”
- Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/μl (New England Biolabs), “*Polimerasa*”
- 30 Agua apirógena estéril (SALF Spa), “*ddw*”

*Procedimiento*

- 35 Preparación de las muestras
- Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.
- 40 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 23 muestras, que comprenden 3 de controles negativos (el 100% de plásmido de tipo natural, 7e3 cps/μl), 9 de control positivo (3 muestras del 100% de plásmido mutante, 3 muestras del 10% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural) y un control no diana.
- 45

Tabla 7 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12
Diana que va a añadirse (5 μl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e2 cps/μl, plásmido de tipo natural 6,3e2 cps/μl	Plásmido mutante 7e1 cps/μl, plásmido de tipo natural 6,93e2 cps/μl
GA231 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/μl	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4

Ddw hasta 20 µl	13,8	13,8	13,8	13,8
-----------------	------	------	------	------

Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

5 Preparar diluciones en serie de la diana (“*diluciones de la diana*”) a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie el plásmido mutante en plásmido de tipo natural para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural: el 10%, el 1% (cantidad total por tubo,  $7e3$  cps/µl).

10 Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a las tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

#### Reacción

15 La reacción sigue el esquema del método de la figura 11.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

20 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

#### Análisis de datos

25 Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/µl.

#### Resultados

30 El presente enfoque consiste en una amplificación insensible a mutantes de la secuencia génica de JAK2 usando los cebadores F3, B3, FIP y BIP (figura 11). Se empleó el mismo conjunto de cebadores descrito en el “ejemplo 4”, excluyendo el PNA y el cebador de tallo-bucle específico de mutante de la mezcla de reacción. La detección de la amplificación de la secuencia diana en el “ensayo de control de LAMP” es indicativa de diferentes parámetros de calidad tales como el apareamiento de bases correcto de los cebadores con el molde, las condiciones de extensión eficaces y la ausencia de inhibidores en la disolución de reacción. A la inversa, la ausencia o el retraso de la amplificación de la muestra de ácido nucleico en el “ensayo de control de LAMP” resalta problemas en la configuración de reacción (es decir, composición de tampones, temperatura, calidad de los cebadores,..) o la presencia de un inhibidor en la mezcla de reacción.

35 Para evaluar tal método de control del ensayo, se analizó una muestra clínica por duplicado usando el ensayo de LAMP específico para detectar la mutación G→T (ejemplo 4) y el “ensayo de control de LAMP”. Cuando se amplifica la secuencia diana de ácido nucleico en ambos ensayos, se obtiene un resultado validado y se considera que la muestra porta la mutación V617F. Cuando se amplifica la secuencia diana de ácido nucleico mediante el “ensayo de control de LAMP” y no mediante la “estrategia de cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP modificada para JAK2”, se obtiene de nuevo un resultado validado y se diagnostica la muestra como una muestra de JAK2 de tipo natural. En el caso de ausencia de amplificación de la secuencia diana en el “ensayo de control de LAMP”, el análisis ha de considerarse no válido.

40 Se realizó la evaluación del “ensayo de control de LAMP” con muestras de plásmido de ADN que contenían respectivamente plásmido de tipo natural y mutante  $7e3$  cps/µl y con muestras que contenían el 10% y el 1% de plásmido mutante en un contexto de tipo natural, 35000 copias totales (figura 12). Todas las muestras de ácido nucleico sometidas a prueba mostraron una eficacia de amplificación comparable, indicando por tanto la ausencia de inhibidores de reacción.

#### EJEMPLO 8 - Estimación de la cantidad de secuencias de JAK2 mutantes en una muestra usando el ensayo de “cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP”

#### 60 Reactivos

Se sintetizaron plásmidos de JAK2 por el proveedor GeneArt (Ratisbona, Alemania) para que contuviesen la secuencia de JAK2 de tipo natural o mutante. En detalles:

## ES 2 535 178 T3

- Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de G en el nucleótido 93526, denominado “plásmido de tipo natural”;

5 - Plásmido de JAK2 cuyo inserto corresponde a la secuencia 93249-93731 de SEQ ID NO: 2, incluyendo una base de T en el nucleótido 93526, denominado “plásmido mutante”.

Cebadores: Sintetizados por MWG Operon, denominados “cebadores”:

10 - GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

- GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

- GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

15 - GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

- GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

20 La base subrayada corresponde al nucleótido mutado en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972). PNA: Eurogentec, denominado “PNA” GM43<sup>NH<sub>2</sub></sup>GAGTATGTGTCTGTGGA<sup>COOH</sup> (SEQ ID NO: 9)

25 La base subrayada corresponde al nucleótido de tipo natural en la posición 1849 desde el codón de iniciación ATG en la secuencia codificante de JAK2 (n.º de registro de GeneBank NM\_004972).

Tampón de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, Tween al 0,5%, “tampón 5x”

30 mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas), “dNTP”

Bst polimerasa de fragmento grande 8 U/μl (New England Biolabs), “Polimerasa”

Agua apirógena estéril (SALF Spa), “ddw”

35 *Procedimiento*

### Preparación de las muestras

40 Preparar disoluciones madre de los cebadores en alícuotas. Es mejor almacenar las disoluciones madre a -20°C, mientras que las diluciones de trabajo deben almacenarse a 4°C.

45 Preparar la mezcla de reacción tal como sigue: cebadores externos 0,2 μM (F3 y B3), cebadores internos 1,6 μM (FIP y BIP), cebador de bucle autoapareado 0,8 μM para JAK2 mutante (LB), PNA 0,8 μM, disolución tampón 1x, mezcla de dNTP 1,4 mM, 8 U de Bst polimerasa. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser 4/5 del volumen de reacción total (es decir, 20 μl de mezcla de reacción + 5 μl de muestra). Mantener siempre los reactivos en hielo. Preparar la mezcla para al menos 23 muestras, incluyendo 3 de controles negativos (el 100% de plásmido de tipo natural, 7e3 cps/μl), 9 de controles de calibradores positivos (3 muestras del 100% de plásmido mutante, 3 muestras del 10% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural, 3 muestras del 1% de plásmido mutante diluido en plásmido de tipo natural) y un control no diana.

50

Tabla 8 - Composición de la mezcla de muestras

Tubo de muestra	1-3	4-6	7-9	10-12
Diana que va a añadirse (5 μl)	Plásmido de tipo natural 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e2 cps/μl, plásmido de tipo natural 6,3e3 cps/μl	Plásmido mutante 7e1 cps/μl, plásmido de tipo natural 6,93e3 cps/μl
GA231 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05
GA232 100 μM	0,05	0,05	0,05	0,05
GA233 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4
GA234 100 μM	0,4	0,4	0,4	0,4
PNA 100 μM	0,2	0,2	0,2	0,2

GA236 100 µM	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampón LAMP 10x	2,5	2,5	2,5	2,5
Bst polimerasa 8 U/µl	1	1	1	1
dNTP 25 mM	1,4	1,4	1,4	1,4
Ddw hasta 20 µl	13,8	13,8	13,8	13,8

Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en la tira. Mantener las tiras en hielo. Mantener siempre la mezcla de reacción en hielo de ahora en adelante.

- 5 Preparar diluciones en serie de la diana (“*diluciones de la diana*”) a partir de la disolución enviada (plásmido de tipo natural y plásmido mutante). La disolución enviada es de  $7 \cdot 10^{10}$  copias/µl. Diluir inicialmente el plásmido mutante hasta  $7 \cdot 10^4$  copias/µl en Tris 10 mM, luego diluir en serie el plásmido mutante en plásmido de tipo natural para obtener las siguientes concentraciones de secuencias mutantes en un contexto de tipo natural: el 10%, el 1% (cantidad total por tubo,  $7e3$  cps/µl).

10 Añadir 5 µl de las diluciones de la diana a la tiras, por triplicado. Añadir 5 µl de las diluciones de la diana comenzando desde la muestra menos concentrada hasta la más concentrada. Cerrar todos los tubos.

#### Reacción

15 La reacción sigue el esquema del método de la figura 5.

Programar el turbidímetro (Teramecs) para incubación a temperatura constante y monitorización en tiempo real de la turbidez con el fin de obtener una temperatura de reacción constante de 65°C durante 1 hora.

20 Poner las tiras en el instrumento inmediatamente antes del comienzo de los programas. Comenzar el programa.

#### Análisis de datos

25 Analizar la variación de absorbancia en cuanto a u.a. para hallar el tiempo umbral para cada muestra analizada. El tiempo umbral es el minuto en el que la absorbancia de la muestra, tras la resta de la línea base, alcanza el valor de unidades arbitrarias que representa el umbral (en este caso, 0,1 u.a.). El tiempo umbral alcanzado por cada muestra se correlaciona con su logaritmo de copias de ADN/µl.

#### Resultados

30 Un subconjunto de pacientes son homocigotos para el alelo V617F de JAK2<sup>1</sup>. El mecanismo de homocigosidad resulta de la recombinación mitótica y la duplicación del alelo mutante, conocido como disomía uniparental adquirida<sup>1</sup>. La heterocigosidad u homocigosidad del alelo mutante de JAK2 se correlaciona con el pronóstico, dando como resultado por tanto la importancia de determinar si la cantidad de copias alélicas mutantes de JAK2 en la muestra es mayor o menor del 50%.

35 Según el presente enfoque, las muestras desconocidas se analizan como no diluidas y diluidas 1:5 usando el ensayo de “cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP” descrito anteriormente en el ejemplo 4. Además, la configuración de ensayo incluye tres muestras de calibrador que contienen respectivamente el 100%, el 10% y el 1% de copias de plásmido mutante de JAK2 en un contexto de tipo natural. Si la cantidad de secuencia diana de JAK2 mutante en la muestra de ácido nucleico es mayor del 50%, se detecta la amplificación en tiempo real de dicha secuencia diana en un tiempo entre los minutos de umbral de amplificación del 100% de calibrador y el 10% de calibrador, ambos en el caso de muestras no diluidas (figura 13, panel A) y muestras diluidas 1:5 (figura 13, panel B). Se detecta un rendimiento de amplificación diferente para muestras de ácido nucleico que contienen una cantidad de menos del 50% de secuencia de JAK2 mutante puesto que se detectan amplicones diana en las muestras no diluidas antes que en el 10% de calibrador (figura 13, panel A) mientras que el minuto de umbral de amplificación en las muestras correspondientes diluidas 1:5 se mide en un tiempo entre el min(t) del 10% del calibrador y el min(t) del 1% del calibrador (figura 13, panel B).

40 Se sometió a prueba el presente enfoque realizando la reacción de “cebador de tallo-bucle con PNA de LAMP” con muestras control (plásmido de tipo natural  $7e3$  cps/µl, plásmido mutante  $7e2$  cps/µl en plásmido de tipo natural  $6,3e3$  cps/µl, plásmido mutante  $7e1$  cps/µl en plásmido de tipo natural  $6,93e3$  cps/µl), con cuatro muestras que consisten en mezclas de plásmido de JAK2 mutante en un contexto de tipo natural en proporciones mayores del 50% (respectivamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90%) y con cuatro muestras que consisten en mezclas de plásmido de JAK2 mutante en un contexto de tipo natural en una proporción del 50% o menor del 50%

(respectivamente el 40%, el 30%, el 20%). Excepto para los controles, se analizaron todas las muestras como no diluidas (5 µl de 7e3 cps/µl para cada reacción) y diluidas 1:5 en Tris-HCl 10 mM.

5 Para las muestras de prueba que contienen más del 50% de copias alélicas de JAK2 mutante y diluidas 1:5, se detectó la amplificación de la secuencia diana tras la amplificación de la secuencia correspondiente en el 100% de calibrador y antes del 10% de calibrador (figura 14). Para las muestras de prueba que presentan una cantidad del 50% de copias alélicas de JAK2 mutante y diluidas 1:5, se registró la amplificación de la secuencia diana al mismo minuto de umbral que para la muestra del 10% de calibrador (figura 15).

10 Para las muestras de prueba que contienen menos del 50% de copias alélicas de JAK2 mutante y diluidas 1:5, se detectó la amplificación de la secuencia diana a un minuto de umbral intermedio entre el tiempo de amplificación del 10% y el 1% de calibrador (figura 15).

15 Por tanto, usando el presente enfoque es posible estimar si la cantidad de copias alélicas mutantes de JAK2 en una muestra de ácido nucleico es mayor o menor del 50%. Una información de este tipo es clínicamente muy relevante ya que proporciona una indicación sobre la "heterocigosidad u homocigosidad" en una muestra que se correlaciona a su vez con el pronóstico de la enfermedad.

### 20 Bibliografía

20 1. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387-397 (2005).

25 2. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148 (2005).

3. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061 (2005).

30 4. Kralovics, R. *et al.* A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779-1790 (2005).

5. Nelson ME, Steensma DP: JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006, 47:177-194.

35 6. James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434:1144-1148.

40 7. De Keersmaecker K, Cools J: Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 2005, 20:200-205.

8. Kaushansky K: On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005, 105:4187-4190.

45 9. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054-1061.

50 10. Smith TA, Whelan J, Parry PJ: Detection of single-base mutations in a mixed population of cells: a comparison of SSCP and direct sequencing. *Genet Anal Tech Appl* 1992, 9:143-145.

55 11. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350-353.

60 12. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989, 17:2503-2516.

65 13. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106:2162-2168.

14. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L,

Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350-353.

5 15. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054-1061.

10 16. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM: Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005, 19:1847-1849.

17. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP: JAK2 mutation 1849G\_T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005, 106:3370-3373.

15 18. Jones AV: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106: 2162-2168.

19. Steensma D: JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *Journal of Molecular Diagnostics* 2006, 8:397-411.

20 20. Iwasaki M. *et al.* *Genome Letters* 2003, 2:119-126.

21. Fukuta S. *et al.* *J Appl Genet* 2006, 47:303-308.

25 22. Ikeda S. *et al.* *Pathol. Intern.* 2007, 57: 594-599.

**Lista de secuencias**

<110> DiaSorin SpA

30 <120> MÉTODO ISOTÉRMICO RÁPIDO ALTAMENTE SENSIBLE PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES Y SNP, CONJUNTO DE CEBADORES Y KIT PARA EL MISMO

<130> E0077147-BEE-EC

35 <150> Documento EP09165252.9-1222  
<151> 10-07-2009

<160> 20

40 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5285

45 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 535 178 T3

ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc 60  
 tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgct tgggtgttcg cgtcgccact 120  
 tcggcttctc ggccggtcgg gccccctcggc ccgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg 180  
 gctgctgcgg cgcagggaga ggcctggtcc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga 240  
 gcccaactg gagggcccc gagggcccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgccc 300  
 cggggcttcg cagacctga cccgccgggt aggagccgcc cctgcgggct cgaggggcgcg 360  
 ctctggctgc ccgatctgtg tagccggttt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa 420  
 ctgtttctct tctgcagaaa aagaggctct tcctcctcct cccgcgacgg caaatgttct 480  
 gaaaaagact ctgcatggga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca 540  
 cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag 600  
 atccagttct tcaggtgtat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga 660  
 cctttccatc tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg 720  
 gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaaacagaa aggatctggt 780  
 atccacccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa 840  
 taagatthta ctttcctcgt tggattgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa 900  
 tatctcgagg tgctgaagct cctcttcttg atgactttgt catgtcttac ctctttgctc 960  
 agtggcggca tgatthtgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg 1020  
 aagaatgtct tgggatggca gtgtagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa 1080  
 ccccaactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttaccaaaa tgtattcgag 1140  
 caaagatcca agactatcat atthtgaaa ggaagcgaat aaggtacaga thtcgcagat 1200  
 ttattcgca attcagccaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta 1260  
 taaatctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atthgaagta aaagaacctg 1320

ES 2 535 178 T3

gaagtggtcc ttcaggtgag gagatTTTTg caaccattat aataactgga aacggTggaa 1380  
 ttcagTggTc aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt 1440  
 tatattgCGa ttttcctaatt attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggTt 1500  
 caaatgaaag ccgagTtgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac 1560  
 ttagctcatt aagggaaGct ttgtctttcg tGtcattaat tgatggatat tatagattaa 1620  
 ctgcagatgc acatcattac ctctgTaaag aagtagcacc tccagccGtG cttgaaaata 1680  
 taaaaagcaa ctgtcatggc ccaatttcga tggatTTTgC cattagTaaa ctgaagaaaG 1740  
 caggTaatca gactggactg tatgtacttc gatgcagTcc taaggacttt aataaatatt 1800  
 ttttgacttt tgctgtcGag cgagaaaatg tcattgaata taaacactgt ttgattacaa 1860  
 aaaatgagaa tgaagagTac aacctcagTg ggacaaaGaa gaacttcagc agtctTaaag 1920  
 atcttttgaa ttgttaccag atggaaaactg ttcGctcaga caatataatt ttccagTtta 1980  
 cTaaatgctg tccccaaaG ccaaaagata aatcaaacct tctagTcttc agaacgaatg 2040  
 gtgtttctga tgtaccaacc tcaccaacat tacagagggc tactcatatg aaccaaTgg 2100  
 tgtttcacia aatcagaaat gaagattTga tattTaatga aagcctTggc caaggcactt 2160  
 ttacaaagat ttttaaaggc gtacgaagag aagtaggaga ctacggTcaa ctgcatgaaa 2220  
 cagaagTtct tttaaaagTt ctggataaag cacacagaaa ctattcagag tctttctttg 2280  
 aagcagcaag tatgatgagc aagctttctc acaagcattt ggTTTTaaat tatggagTat 2340  
 gtgtctgtgg agacgagaat attctggttc aggagTttgt aaaattTgga tCactagata 2400  
 catatctgaa aaagaataaa aattgtataa atatattatg gaaactTgaa gttgctaaac 2460  
 agttggcatg ggccatgcat tttctagaag aaaacaccct tattcatggg aatgtatgtg 2520  
 ccaaaaaat tctgcttatc agagaagaag acaggaagac aggaaatcct cctttcatca 2580  
 aacttagTga tCctggcatt agtattacag ttttgccaaa ggacattctt caggagagaa 2640  
 taccatgggt accacctgaa tgcattgaaa atcctaaaaa tttaaattTg gcaacagaca 2700  
 aatggagTtt tggTaccact ttgtgggaaa tctgcagTgg aggagataaa cctctaagTg 2760  
 ctctggattc tcaaagaaaG ctacaatttt atgaagatag gcatcagctt cctgcaccaa 2820  
 agtgggcaga attagcaaac cttataaata attgtatgga ttatgaacca gatttcaggc 2880  
 cttctttcag agccatcata cgagatctta acagTttgtt tactccagat tatgaactat 2940  
 taacagaaaa tgacatgTta ccaaatatga ggataggtgc cctggggTtt tctggTgcct 3000  
 ttgaagaccg ggatcctaca cagTttgaaG agagacattt gaaatttcta cagcaactTg 3060  
 gcaagggTaa ttttgggagT gtggagatgt gccggTatga ccctctacag gacaacactg 3120  
 gggaggtggT cgctgTaaaa aagcttcagc atagtactga agagcaccta agagactTtg 3180  
 aaagggaaat tgaaatcctg aaatccctac agcatgacaa cattgTaaag tacaagggag 3240

ES 2 535 178 T3

tgtgctacag tgctggtcgg cgtaatctaa aattaattat ggaatattta ccatatggaa 3300  
 gtttacgaga ctatcttcaa aacataaaag aacggataga tcacataaaa cttctgcagt 3360  
 acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atcttggtag aaaaaggtat atccacaggg 3420  
 atctggcaac gagaaatata ttggtggaga acgagaacag agttaaatt ggagattttg 3480  
 ggtaaccaa agtcttgcca caagacaaag aatactataa agtaaaagaa cctggtgaaa 3540  
 gtcccatatt ctggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagtttct gtggcctcag 3600  
 atgtttggag ctttggagtg gttctgtatg aacttttcac atacattgag aagagtaaaa 3660  
 gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaaggacag atgatcgtgt 3720  
 tccatttgat agaacttttg aagaataatg gaagattacc aagaccagat ggatgccag 3780  
 atgagatcta tatgatcatg acagaatgct ggaacaataa tgtaaatcaa cgcccctct 3840  
 ttagggatct agctcttcga gtggatcaaa taagggataa catggctgga tgaagaaat 3900  
 gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgctg 3960  
 tggactatta ttacatatat cattattata taaatcatga tgctagccag caaagatgtg 4020  
 aaaatatctg ctcaaaactt tcaaagtta gtaagttttt cttcatgagg ccaccagtaa 4080  
 aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgaaga agtttcttaa acattgtcag 4140  
 ttaacatcac tcttgtctgg caaaagaaaa aaaatagact ttttcaactc agctttttga 4200  
 gacctgaaaa aattattatg taaattttgc aatgttaaag atgcacagaa tatgtatgta 4260  
 tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatggt ttacacacat 4320  
 gagggctggt gttcattaat actgtttctt aatttttcca tagttaatct ataattaatt 4380  
 acttcactat acaaacaaat taagatgttc agataattga ataagtaact ttgtgtcctt 4440  
 gttcatttat atcgctggcc agcattataa gcagggtgat acttttagct tgtagttcca 4500  
 tgtactgtaa atatttttca cataaagga acaaatgtct agttttattt gtataggaaa 4560  
 tttccctgac cctaaataat acattttgaa atgaaacaag cttacaaaga tataatctat 4620  
 tttattatgg tttcccttgt atctatttgt ggtgaatgtg ttttttaaat ggaactatct 4680  
 ccaaatTTTT ctaagactac tatgaacagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc 4740  
 caggaatatt gtcaccttt gagctgctga ctgccaataa cattcttoga tctctgggat 4800  
 ttatgctcat gaactaaatt taagcttaag ccataaaata gattagattg ttttttaaaa 4860  
 atggatagct cattaagaag tgcagcaggt taagaatTTT ttocaaaga ctgtatattt 4920  
 gaggggttca agaattttgc attgcagtca tagaagagat ttatttctt ttttagagggg 4980  
 aaatgaggta aataagtaaa aaagtatgct tgtaattttt attcaagaat gccagtagaa 5040  
 aattcataac gtgtatcttt aagaaaaatg agcatacatc ttaaactttt tcaattaagt 5100  
 ataaggggtt gttcgttgtt gtcatttgtt atagtgtac tccactttag acaccatagc 5160  
 taaaataaaa tatggtgggt tttgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 5220  
 tgttatttat acaaaactta aaatacttgc tgttttgatt aaaaagaaaa tagtttctta 5280  
 cttta 5285

5 <210> 2  
 <211> 149939  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 535 178 T3

atgattgaag atagacttcc acactttgtg ggtgaatcat acattttttt taaatataca	60
ttttccctgt tgtaatttga cagagtatth ttctctctca tcagcttact atgatgtctc	120
ccttactcct ggttatttca gttgtgagta cgctgacact actagatcta acttaagtca	180
aaaggagaaa tttgtcataa ggaagtatth tcaagataga aaatgcatga agttttgggtg	240
gaccttataa gaaagagga actgaaaagc tatggggaca catactgccc acattctctc	300
tctctctctc tctgtggcat tctctctccc tatagcaaat cagctttctg tgcaagaatg	360
aagatggtaa cctcatagtg gcagccttaa ctttagagca tgggtaacct catttcaagt	420
gaacagaaaa gtctgatttg ctgtttttga atcccaactc caaattcccc aggagtgaga	480
ctctgatggc tcagcttggc ccaatcaagg gttgtggga agcaggggtg cacaaaactag	540
aacgtaggtg ccagaggctg gctactctgg gtgaagagga cagttctcag caaagaggac	600
agaatcctta gtctaaatta ggactcagga attaagtctc tgagtctctg taaactaaca	660
attatgctag ggatttattt ttatttttta ttttatttta ttttattttt tgagatggga	720
gtcttctctc gttgccagg ctggagtgca gtagcatgat ctggctcac tgcaacctcc	780
acctcccagg ttcaagtgaa tctcctgccg cagcctcctg agtagctggg actataggca	840
catgccacca tgccctggcta attttttgta ttttttagtag agacaggggtt tcaccatggt	900
agccaggaga tcttgatctc ctgacctgtg gatccacca cgctggactc ccaaagtgct	960
gggattacag gtgtgagcca ctgcgcctgg ccgaaatttt gtttttaaga gtgaatgctg	1020
gcatgaatcc tttcacacac acaaaaaatg tttttcgtga ataggcaact atagtctaa	1080
cagttttaag ttaaattttt taaaagtagc acatagtatt aatggtcatt ttacatattt	1140
tgccaaataa ttatcctcac ttgaaagagg ttattaatc ttggcttaca aagggaaaac	1200
tgttttgggt ttcaagcacc aaagttaat acatccagtt atctcaaggg aatgagggat	1260
ctgttccactg gcaatatctt ttttgttttc cttttctttt tgtgattgaa agtaaggata	1320
agggaaactga tgttagagaca aggacatgct gaagtaccga ggaggtattg gaaaatttct	1380
ttgccatagc caaccaaatt ttggaataaa tggactaaa atatctggat gattttagt	1440
aaaaaaaaaca ttgcttgctt gtctgtctac ttgattaata ccccttgctt ttgtcttttg	1500
gcttataatc ctacatttgg aataaataag cctctttcca tattttattc ctttctgcct	1560
tcaggaaagt acatcttccc tgttttggaa agaaacaaac taactcctgg acttctcccc	1620

ES 2 535 178 T3

agcccttctg ttgagcctgt ttccctttcc aaggactttc ctgcatcttt ttttgtgctc 1680  
 acatttatgt ccctccttaa gaatgatggt ttcagtctca tcatttaatg atatagttct 1740  
 gttttttaaa attcaaatgg agatcttcac atttatctct attacaactc agcccttatc 1800  
 ctaccagccc acacagtcct gtgtagtgca ataaactgtg acaataactt caatcttcct 1860  
 aataaaattc aacaaatttc ttatacctcc cagcttggtt atatctgtaa attggctctg 1920  
 ccacagatat aatagacatt tgataactgt gctaagggtt ttaaaatact ttttcaccta 1980  
 atcttcaaaa tctctctaca ggggagatta ttatctctcat tatactgatg aggaaacaga 2040  
 ggcttagaaa atctaaataa actttcctgg caaaagctgt gattgaaaga aacctgggtg 2100  
 gtctggactc ttaaagcgta agttcttaaa cccttgcca tggattttca accgtggctt 2160  
 tatgtcaaac cacctaaaaa tgtaaaaaag ttatagaagc caatgcgcca tctcacactt 2220  
 actgaggcag tcttgttggg gtggggggaa ggtttggca tagcagtcaa gaatcactgc 2280  
 tgccatgctg gccaacactg gaaggacaaa acctcaagac actacacaca gccccacagt 2340  
 caacaactag ctgttaagtt ttcccattag atcttgccac aaagttttga atctaaatgt 2400  
 gttaccttac agctcatatt tcttgtttct tcatattgta tgaatgtttt gaaagacttg 2460  
 gtcaaattcc ttggaattct tttcatcatt atcaaagaat aagggaatt tctgaaatg 2520  
 tttgccttga gtagcaaatt tctagtgatg ccaactaccag gaatcacata aagagctcaa 2580  
 aagtctctgt aatacagagt gaaaaaagct caacattcca ggtagcatt gacttaaaat 2640  
 catgtcttag tgatgagga ggctttcact ttctgaatga caggaggcaa gttgcttcat 2700  
 cttctatgt ggggagacag aagatttctc aattctatag gcttatgaat aatatacccc 2760  
 ttgtccacct tgtcttccat acccacatct ctaatattaa gaaaataacc tgetccccc 2820  
 caaaaatc ctcaatattc accactcca aatggcttct ccctgcaatt caccaatttc 2880  
 aatggcttc tcctgcaaa caggctgtgg acagtaagag ataccatgcc tagttacata 2940  
 agtatatcac tgcaaaatat agaaacatca cttataatga aagtaatact gtttcagagt 3000  
 tctaaaacaa gcattttctt ccctcacia aatatcacat ttccatttcc acagttgtga 3060  
 tgettttcat ttacctga cgtaagctc atctttagct cttcttcatt atgtgggtct 3120  
 gtgttctagc ttttacctca gtagcagtt ttgtttgag gaaaaagga actcttttgg 3180  
 tagtactgt ttgtaattgc ggcttgata ttctaagcca ttgagtcaca attaataatt 3240  
 agaaattctt actaacttg cccatatatt acctatgaag cagtagccgt aggaatgcaa 3300  
 tttctctgta aatccctccc tcttatacag ctctagttca ttatttaaaa gattcaggg 3360  
 gaattcaagt aatttcctat gctgctatca tttgcttaaa gaccttttgc aatgggtctt 3420  
 atgtaagaag aatgcagga gttgcttgg tgaggtttat ttaaagaaac cattaagtgc 3480  
 aagacagacc tgaagagcag catcagttgt gtatggggaa acaggagcta tgaatgcgtc 3540

ES 2 535 178 T3

acttcattta ggttgacaga aagagggcta atacttgaaa aaaatcccta cacgatctgg 3600  
 tgccaggcta cttctttggc ctcacctctt accactgccc cctccttccg tgtcctccag 3660  
 ccacagtgac ctctttcctg atccttgaac ttgccaaaaca ctttcccttc tcaaggtctt 3720  
 tgccttcagg agtccctctg cctgaaattc ttttcccaga tagtcatggg actggttcat 3780  
 tctcatcctt cagatctctg ctcaaagtgc acttattcta ggaaatcgtt cctggccacc 3840  
 gtaaaatagc acacccccctc ctcactttct actccttttc tttgttatta tgtatatggc 3900  
 agcagaaaac tatgcatttt cttagtggca attacacacc ccgcacatta tgcatttaaa 3960  
 gcgttgtttg ttgttttgtc gcttccatca gaatacaatc cagtagggca aggagtgtgt 4020  
 ggggtcgtgt tcacctggtg tctctgggga cctacagccc ggcacctagt agacactcag 4080  
 taaatatttg aatgaatgaa tgaggccctt tggcagccgg gaagcccgtc acagccgttg 4140  
 tctccaccct ctcccgggct acaccaggcc acgccggtaa agttgtttct cctctaggag 4200  
 aaacattcgc taggccttgt tgccaacccg caggcggctg ggcgcttcat cccaccctca 4260  
 cccctttcca gccaaagggtg ctgatgggag tcaggctctc gagggcgcat tgcacgaaa 4320  
 cagcgtgtgt gagcgcgttg tccccggccc ccggcgccac tccccctcgg cctagcagcc 4380  
 tggactgggg aaggacgggt ctgctgtacc cgggaggtgg aaggaaaagc cgaaagcggg 4440  
 gaagtgtgcg ggaggggagt ctccgcgcgg aggcagccc gcctcctcca gtgcaggtg 4500  
 cgcgctgggg agccagccag ggtgagtcac tccccggcgc ttccttgag ggcgcgcc 4560  
 acacacacac ccgccatct agtgagggcc gggcccagcg ctggcgcccta gctccagccc 4620  
 ggcaccagcg tttcgcgagg cgcgcgcgcc ttaacttct tgcgcgctca cgcccagggg 4680  
 ccgtcccagg aatctccaag cgcgctcgcc ggcttcccga gaggcagctg ccctgcgtgg 4740  
 cccgcgctg ccggtcccgc gaccagcacc gagcggcgca cgcgcaactgc aggacgcgcg 4800  
 tccgctctc ccccagcctc tatccggccc ggtctctgc cattcgggga gactgcaggc 4860  
 caaccgggag gctgagttcg aagctagcag ggcggcggaag ccagtgtcgc ccgcgcgctt 4920  
 gagaagacgg tgtggccccg gagaggggtg agacaactgt gacgggcttc ccggctgccc 4980  
 gaagtgggag tgggtgtggg ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc 5040  
 agcggacgcc gctaacggcc tcctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgct 5100  
 tgggtgttcg cgtcgccact tcggttctc ggccggtcgg gccctcggc ccgggcttgc 5160  
 ggcgcgcgctc ggggctgagg gctgctgcgg cgcagggaga ggccctgtcc tcgctgccga 5220  
 gggatgtgag tgggagctga gcccacactg gagggccccc gagggcccag cctggaggtc 5280  
 gttcagagcc gtgcccgctc cggggcttcg cagacctga cccgccgggt aggagccgcc 5340  
 cctgccccct cgagggcgcg ctctggctgc ccgatctgtg tagccggtgg gtgttatctc 5400  
 tgctggctt ctgggtgggg ggcagcagct gtctctccac ccccttcta ccttttggtc 5460  
 ccgctgccc cctgctagtg gcagaaaact tctgagccag aaaaatcttc ctctttaaga 5520

ES 2 535 178 T3

cgacacctag aacgagtctt gctggtgata tttgcttcca tttgtgtctt ataattccct 5580  
 cgctcccgcc tccttattcc ttttaaaat tttctagaca cttaaacagc ctagaaaaag 5640  
 catttgtttc ccctggattt atgtggtagt agttaactgc tgcttctgtt tttaggtttc 5700  
 agaagcaggc aacaggaaca agatgtgaac tgtttctctt ctgcagaaaa agaggctctt 5760  
 cctcctcctc ccgcgacggg ggggtgtctg tcctttatcg ctgcagtaaa ggcgaagggtg 5820  
 tctggagctg ggagtgcgtg cgtaggaag gttggaagcg tgtgaagaga ggcagggtc 5880  
 attgttgctt actcctctga aaatgtcagt gctaaacttt taatgttgat ctgggagagt 5940  
 aatthtgggg tgtttgttg ttcgtcttg atcctttaag aaacatthtt ttgttgctt 6000  
 tacacataac gtgactttgc agagaaacga aaaacgttgt ccattaccct ttcttcttaa 6060  
 gcagccagag attcttaatc ctttaagag gagtatttcc aagcaataag agatagcttt 6120  
 tgggagaaca cgttagctat tcttgctggg gtttctgcta ccacattgaa tgtttcctca 6180  
 tggthttatc tgcctaagct tgcgtgtcg gttgaattta cccagthttg tttccagtaa 6240  
 ttactaatct gttaggagaa actccatttc tctgaatgaa agggtaggag cggctgagta 6300  
 tggagaagga aactggaagt gggataaagg gaaatgattg cthttggtht cataataagt 6360  
 ttgtacagtg agthtggg ctactgcaa taagatthtt gtatccctc tccagaatgc 6420  
 ttgggaccaa aagtthttg gathththtt aaaaathttg gaatgthtgc atatacaaaa 6480  
 tcagacatct tgaggatggg acccaagtgt aaatacgaaa ttcgthttgt tcatatagac 6540  
 cttattcaca cagccactaa gtcatttgca ataththtaa tacgtctgtg catgaaacaa 6600  
 agthtgtatt aagtacctat gcggggaatt tcccctgt agcatcatgt tgggtctcaa 6660  
 aatgthtcag atthtgcagc thttcagata agggatgatc agcttgatt ttgatataac 6720  
 acccagaaca thtgaagatg aataatcaat thttggctc ccttccccca tccgctcac 6780  
 cttataccac thtaagtgtg agaathattt gcttgtagat gcathtgtct gthggtgtgt 6840  
 aacgtatgta cagactggat gtatccagca ctgcttaa tagtagatgt atttacctga 6900  
 ataggaaagc tgcagtactt gctggccaga agagcacacc atgctthtt ttgctctaac 6960  
 tgaatatact gtathtgc aaatagcag thttaggagc tcathaggga atthtgtgtg 7020  
 tgtgtgcctt tgggtgattg agacaggtgt ctcagatatg ggaagggaat atgacattgt 7080  
 thctcttca cctggctatt actgaaaggt gggatgctt tgaggcagaa taggaaagtg 7140  
 cattggctt ggagtgagat ctggattga atcctgggt tcttgccact taagagthtgc 7200  
 attathtacg gctggctatg tggctcaag cctgtaatcc cagcacttht ggaggctgag 7260  
 gaaggaggat cacttgaggg gaggagctg agaccagctt ggccaacatg gtgaaacccc 7320  
 atcttacta aaaatacaaa aathagccgg gcgtgggtg gcacacctgt aatcccagct 7380  
 actcgggagg gtgaggcagg agaathgctt gaacctggga agthgthgt gcagtgagcc 7440

ES 2 535 178 T3

gagatctcac cactgcactc caggctgggc aacacagcaa gactctgtct aaaaaaaaaa 7500  
aaaaaaaaag agaaaaaaaa agttatatta tttacgactc ttttagcttc actttcttat 7560  
aagattgttg tgagaagtga gtaagacaca tgcaaagtgg taaactgcct ggctgtcata 7620  
aaagtcttgg ctactatcac ggctgggagg caaaggagat tcagagaagg gcagaatgac 7680  
tgcataaggt gatctgcctg taactcgtgt ttccctcctt ctagtataaa gagataaagg 7740  
acttcaaggt cttaaactgg tgagggagta ttacagcctt tgtatggaaa ggtttgactt 7800  
tgtgtctctg cttaaaccct catttgtgtg ccctaccaa ttattgtgct gcccccttgt 7860  
ggttaactgt gctaagacct ttcttttgct cttctcccat tacatttccc acccttcccc 7920  
actccctttt agaccctcc tcttagctcc cagtttccca aactgtgtgc caaggtgccc 7980  
agagcacctc aggcttgaac ttgtgtttg agttggttca tggtttcaat attagatacc 8040  
tacaccctgt tctacaatgt catgtctttg taagatgta ttttcagagg ttgctccgat 8100  
aaaaagcaac tactacatga aaatgaatgt agaacaggaa atgacagtgt ggtattgtcc 8160  
aatttgattc taaggtttga taagttctac agtgctctac actaagttgt aaggacataa 8220  
ctactaagta agttgttcaa acctatttct tttggcctgg ggggtgctg gaaaatttgc 8280  
taagactcag agctccctga atgggttgg aaacctctgc cttagctttt agtttgcttt 8340  
tctgataaaa ttattgatat aaagctagta ccagctgatc atggcttaat atatttcctc 8400  
tcctatgtaa tatgtttata acttctgccc agttcttca ttttaaaact aatcctattg 8460  
ctaacttgtt gtactagtca ctctctggtt ttctctgtac tggctctctg cttctacttc 8520  
tgttcatctc cttaaactcc gaatgcccga agtgaaaagt accattttct accccttaat 8580  
tttcttctaa tcatgtaggc tttaaattag gcatcatctt taaactactt ctttcattta 8640  
cctcttattc ccattcaaaa tgtccatatt tcctttcttt ctcatatctc tgcttccct 8700  
cctttactgt gtgaatcca ggacacatt cctgagccta gaatattgaa agtcatttga 8760  
acttctgaga attcagtgtc ccttcttct gtttatctc aatagagatt ccaactctaat 8820  
actccttatt atagcattcc cttgccccaa aaccttcagt ggcttaccat tttctactta 8880  
ttaaatcttc ctgactttta agatagtcta ttatcaatcc ctgccctatt tatttagtct 8940  
tttgtctaag gatctctagt ccttaagctt gtaagctgat ttccacactt tctaataata 9000  
agctatgctt cttctatcct ttaatctttg cccatgttct ccatccctct ttttttct 9060  
ctatttctgt agctctttag tcttagaaca ttttcacatg gtttaattat atgccatgct 9120  
ttagttgttt gatagttatt tcctagtgt tagccatata ttttcaagtt gattgtgtat 9180  
tctttgagga gcagtacctt agattaaaaa aaaaccacaa cacacagtgg agagcacatg 9240  
ggcagcattc aagaaataca tgttgattgt gtgataagga actgtagtca ccaaacaat 9300  
atttgtaat acttgcaatg taaaaggtag ttggctgtat tcaaaagaga aataaagaaa 9360  
tataaaatag gctcctttcc ctaaggactt acagtataat tgggcagata agctaataa 9420

ES 2 535 178 T3

taaaagttac agatatttaa gaccacttga gttgagcaga gattttgcat aataggaagg 9480  
 aactggtaga gggggaagc aaaggcaaaa tatgtatata tgtatgatat gttcagagag 9540  
 cagtacataa ataacttgac tgaaatgaag atttgtgtga aagagtagta agaaattgtg 9600  
 ttaaaaatgt agttggaatt tgattatgga tgtctttaa tgctaggatg agaagaatgt 9660  
 actttgacct gtagatatgg agaagcttta aaagttttga attgagaaa agtttgctga 9720  
 aataagtatt ttaggaaaat caaagcagca ccagtgctag gtctcatatg aattggaaag 9780  
 agaatggtag aaagaggtag gaaaataatt gagccctgaa gtaatgagga cttagaaata 9840  
 agtcagattg cagagatgac acaagacatt attatggatt ggataagaag ggagaatgga 9900  
 ggggagaaga gtgattaaag attaccttac cttgaaggtt tgcttttcag tgacggagga 9960  
 aatcaaagag tgttgactct ccaagacatc ttagaacatc taagtctata tgttttgtat 10020  
 attaggactc agaccagaga gatttaaaaa tgtgtccaaa gttactcagc tagttaatga 10080  
 caaagaaact gccgtttgat taatggcagt tactaacaaa aatagttatg gcagtgttag 10140  
 tagctggtag aggggatgta gacagttgag cgtatattgt ggatatgttg agtttgcggt 10200  
 ggccgtggga tgggcaagtg aaaattgata gcatacagtg ggacatatga ctagaatttg 10260  
 ttagcgaagt taaggctggt gctgtggtac ttaagagaaa agagtgggat tgcccataat 10320  
 tagcgggtg gtgaaaggag aggaatgggt aaaggagaca aagaaaaaaa cagtatgaga 10380  
 ggcaaattag tggataggtt aggaggcgga atgatcaaca tgttgatcat tggcaagaaa 10440  
 tgagaagaat cagatccaaa aaaaggtctt aaaaagatgt attcgtgttt ttcctaataa 10500  
 gaaatctata aaaacagaag aaaattgctt atactttccc tacgtggaaa taaccactgt 10560  
 taatatattg ttctctccgg ttttaacaaa gacctttgga tttgacagtt gggatgatcag 10620  
 tggagacttt tccaaagctc tccatcacta ggactaagga tgagaatttt aggcataata 10680  
 aaacctagga gatatttttc aacagattgt cattcgtctg tatcgtctta tatatcacac 10740  
 tgtccaggta ctattcttcc tgtgtgcatt ggttctgtgt ttttttctga atgatagaag 10800  
 gttagacaag ccatctctgg gtgcttttgt gctggtaaaa tttgaataaa gtgataaaat 10860  
 atttgtttct aaaaggaagg agaaattctt ggtcgataac ttataaatct gagggttgaa 10920  
 tgattgatga aattaggggt actggaaaga acaaagagaa gcattattta ttttgaagct 10980  
 tttctgtata gttacaaagg gttactaggt ttagaatggt ccatgggctg tttactttgc 11040  
 ttgcatgttt attttgatct tccaagaac attcttctgt tcatcttttt agtatgttat 11100  
 tggaaacaga gtactcatta gttcttacta agtggtttta gtttaataaa ttatgattat 11160  
 gaaataaaat gctattaggt aatattttta taatataaag ggccatgtga tgtgagtaag 11220  
 tgcactgttt tggaaatcag gggataaggg actgacctg ctctcagcat ggtatatgat 11280  
 ttcaggcaac tcacgtaatc agtgagtctt gtctattgag ggaatggact aaatcttttc 11340

ES 2 535 178 T3

tagaaaattt aaaagggtgg gatcacatgg taaaatgtgt ataaagtta aaaaggaat 11400  
ggtttaccaa tgtttatgac aaaaaccagc aaactcttc ccaccccccc accccacatc 11460  
tccttttcta gtctctaatt cctgtacacc aggaaccac ctgtcctctg tactttgccg 11520  
ttttcacctt tataatgaat gaattgttta gcatcccctc taaagcctct ccattcagtt 11580  
gtgtagaaga gctcatcccc tttgccttca agggctttac cattatattt ctctcctctt 11640  
tttcttgctt tctcaattct tcctctact ggattatttc catcagcatt actctgattg 11700  
ctattgctgt gtaacagaaa ctacccaaaa cttagtgatt taaaacaact actttattag 11760  
gctcacagat accatgggtc agtaattgag acagggcaca ccagggatga ctttgttttt 11820  
gctccacaat ggctactagg acatgagttg ggaagaattg ccagccaggg gtgacttgaa 11880  
ggcaaaggac tggaatcatc tggaggtgct ttcactcaca tgatgggtag ttgatgctgg 11940  
ctettgactg ggatgtagc tgggctgta actggagcat gtacatgtgg cctggatttc 12000  
ctcacaatat ggtggcttca ggtggtcac ctttcatagt ggtgagtaga gaattaaag 12060  
tgagtgtgct tcagcataaa tcttttatga tttagccttg gtagctgcac agtataactt 12120  
ctgccatgct ctactggttg taagggtcag aagcctgtcc agatttgatg ggggagtggc 12180  
aagttcacac tgcagaagaa aaacatgtga gatgggaaat agtgttatgg ccatctttgg 12240  
acaattatta atactattgc catagtttgc cattttgcca aacttcacat ccctcctgta 12300  
tctgaaatac acgcaaaata cactgagctt ctctcaaag gtccctaatt cacatcccat 12360  
catgacagta actcagagtc cagtatctca tcatataaat cagggtccagg tacagaatag 12420  
tttcttgagg tatggttaat tggatatggt tcttcttgaa ctgaggaccc atgaagagac 12480  
agtttatatg tcccctgcat actttacaaa atggaaaagg cacaggttat ctgcagtaga 12540  
cattcctcct caagaagcat gcaaggtagg cacagtctgt agcaattctg caacctcact 12600  
gggcacatgt tgcagttcc ttgattaggt ctcagtcctg cttcctggaa gtcattetta 12660  
ataggacata ggcttcttct gtttttgggt ttaccttctg aattatttat ctccccacc 12720  
cctgcacca acccatataa attgctttgt atttgtaaga gtagctttct gagcttgctt 12780  
cctgcctgta gtgctccaga gtccaaaggc ccccttttat atagcaactg tccctttcat 12840  
tccaagctaa tacaactcct ttaaaaactt tgtggacttc ctgtgtgtaa gtttataatc 12900  
tgtactgcc aaccacaaa tctcttttga gaggaactct ttctcccct aagctctgtg 12960  
tgagtctgct gtgggacaac acccttaaga tccttagata atatttcgct tgaaaggatc 13020  
tatgaggtac tgatttagat ctaagaaag gatcttataa tcacactcta gattggatct 13080  
ttgctctgag gcccttttta tttgacactt tgctggctga aaagattggt ctgagtcct 13140  
tacatctcct tgaaattcta ctcaaaaaat gaatagctta ttcttttagtt catctctctg 13200  
ttctctcaat tataagggca gctagaagaa gccaaattgc ttaacttcc tgctgagaat 13260  
ctcettaatt cattaggtca ggtatgtatt ttattttcca tgtaaatgta ggtgacagtt 13320

ES 2 535 178 T3

ttgctaaact ttgccctagt atgtaacaag ggtgtcctct tattcagctt tcactatcat 13380  
 ttctctcact ttgcttgaag tcctcactga cagtctcctt gagggctctt aggetcccat 13440  
 gaagtttcct caagaccctt tacatgtgtg aacacaaaagg gtccttatct gttcctggct 13500  
 atatagcagg tccttgaata actgtcattt cttcataacg ttgataagaa aaaaatggat 13560  
 tcctggctgg ggccactggt tgtgtggagt ttggacattc tccccacgtc tgtgtgggtt 13620  
 tttccgggtg ctccaatttc ctcccacatt ccaaagatgc atatgttagt ggatcgggtg 13680  
 gtctaaatgg tctcagactg agtgatcatg tatggatgag tgtgccttgc agtgggtgat 13740  
 gtcctgtcta gggttggttc ccacctgtg ccttgagttg ctaggatagg ctctagccac 13800  
 tcgtgactga actgaattgg gttaataatt atcctacttg tttttattag tctttcttaa 13860  
 atgtgtgat agctcacatt tatttcagtg ttttaataatc agagtgtttg gaatctttac 13920  
 ttagaagttt gatgatgttt ttgtggccat aaatatgcca taggaacttc cttatctcaa 13980  
 ttagcctatg gaaaaatgga ttttgttaca cattgtttca cttaaagtca cagtttcaa 14040  
 gaacctattg aagacagtga ggattaactg tactagaact gtttcctaac ccactggttc 14100  
 ttatcagaat tacctaaagg acttattgaa acacaaattg ccgctgggcc ccacccccag 14160  
 agtttgtttc attagctctg gagtgggact tgaggatttg catctgtgag ttcccagggtg 14220  
 atctgataat gttgatctgg ggcctagatt gtgagaatta ctgatttaaa ccagggattg 14280  
 gcaagatfff tctattaagg atcataaata aaatatttta gactttgtgg gcaagattgt 14340  
 ttctcttgca cctactcaat tccgcctttg tggtgcaaaa gcagttatag acaatacgtg 14400  
 aatgaacaga cgtggctcat ggctgtgttc tcataaagct ttatttacat aacaggcagc 14460  
 tggctaaatt tggatgtgtg gaactgtgct ctgccaatc ccaatttaaa tcattacttg 14520  
 actccacatc tcttcaagct atggccccat ttttcactcc cctttggaac aaaactctct 14580  
 gagagttgtc tgtatttgtc tctttttatt ctttcataaa aaaattatct attttttgaa 14640  
 cacatttaaa tgtcttagaa ttcaaaaagt agtaaatatc tttgtacatt tgtcagggcg 14700  
 tgtgtgtgtg tgtgactata actaaagatt aagtagaaga ggagttgctg attcaaaagt 14760  
 ggtatatggt actaagttca acaaatattg ccaaattgac atagaaatac caagttatgc 14820  
 ttttctacac ctttactaac attgtgtttt cagatgactt gattgttgcc aacttgagac 14880  
 gtgaaaaata gaatctcatt ataattttaa tttgcttttt attctccttt tttagggaac 14940  
 tcttcactca tatcttggcc cactttctat tggatttgtg gtccttttac tttgctttgt 15000  
 gggagctctt aactaagga agatagcttt gagtttgcca aatgagttgt tttccctagg 15060  
 ttgtctcttt atctttttga ttctgtagat agtgtgattt tgttgttgtg catctaggta 15120  
 ggttccctct aacctgaaa ttatattttg agattctccc ttgttttctt gttccatctg 15180  
 gaatttatac tgatgcaaga tataagatgg gacgcaactt ttttccceta gatggttgtc 15240

ES 2 535 178 T3

cagtttcaat actatttgtc agataatcct tcttttctct gctgctgtga aatgctgggt 15300  
 ttttaaattg tgtatgtagt tggatctatt tctggacttt gtttcattct aaaaatggct 15360  
 cctctgaaac catattgtga gttcttgggt agtgaacatt tctatttatt tgtttccaag 15420  
 tcctgtataa tatttattag catatgggag gcattcaagt acttgaaaat aaaatgaata 15480  
 aatcaagcat ttaggaatag aagcagatct ttttgccaat tattcatttt agttattcta 15540  
 ttttaattctc tatttctgat tttaaacttg aatttaacct tggttttcca ttttagtttt 15600  
 accttttttt taaactttat tgtgaagtat taagttattt tttgtactta ctgaatgggc 15660  
 atttgctaac ttatgtgtct gctcttatta gtctattttt ggctctcaaat tgttaaaaaat 15720  
 tcacagtata gttttatttg tatcaaattt gctactgagg gaagcttgtc atttcataat 15780  
 ggcaatccat aggataggtc aagtcatttg agattggaac cattaaggat aagttcattt 15840  
 aacattgaat tattagatct gtggttaatt ggccagggta gagaagacag aattacaggg 15900  
 aagctggat tttacaactt attatttttag aggggtcaaat ttagaataat atttttaagc 15960  
 tttttaagta gaagtatatg gatcacctga ggtcaggagt tcaccaccag cctgactaac 16020  
 atggtgaaac cctgtctcta ctaaatacaa aaaaatagcc aggtgtgggt gtgcatgctc 16080  
 gtaatctgag ctacttggga ggctgagaca ggagaatcgc ttgtacctgg gaggcagagg 16140  
 ttgcagtgag ctgagatcgt gccattgcac tctagcctgg gcaacaagag tgaactctg 16200  
 tctcaaaaaa taataaata aataaataa aataaataca taaatagaag tatactattc 16260  
 tgattctctt atttatatgt ataatttatt tttttaaata catgaggat tgtagatttt 16320  
 ttggtttttt tgaggagggg cgggggtgat gtgaaatata gttttcattg catcagatct 16380  
 tcagttgtaa tgatattgct ggaatccacc atttaggacc ctgtcttgtt aaaaaaaaaat 16440  
 tatecttgcc ttcacccta cccctcctg ccacagaact ttaaaggtaa gtattctgcg 16500  
 ataattggat tatatttact attatgaaaa tttaaaatta ttagaagtaa aatgaaatat 16560  
 acctccattg tagtaagttt gattcacagt gcctctgggt atgggtgtca gtaaaagtaa 16620  
 cactgtatta ggaacagtct tcatgggtgg agttctctcc ttttactctt ctgttagttt 16680  
 gttctttttt tttttttttt tttttgagat ggtttactg tcaactcaggc tggaggacag 16740  
 tggctcgatc acggctcact gcagccttgc ctccctggg gtccagtgat cctcctacct 16800  
 cagcctcctg agtagctggc actgcaggcg agtgccacta ggctgggta atttttatat 16860  
 ttttttttgt agagatgggg tttcacctgt tcaactcagtc tggctctgaa ctctgggct 16920  
 ccagcaatct ttctgcatca gcctcccaa gtgctgggat tatggttctg gagccaccgc 16980  
 gcatggcctg ttagtctgtt ctgcatgctc tataaagaaa tacctgaggc tgagtaattt 17040  
 ataaagaaaa gagatttaat tggctcatgg ttctgcaggc ttacaagcat ggggctgaca 17100  
 tttgctcagc ttctggggag tcctccggga gcttttactc atgggtcaaaa gctaagaggg 17160  
 agcaggaata tcacatttca agagctggag caaaagagaa tgtggggaag gtgcacacac 17220

ES 2 535 178 T3

ttttaaacag ccaaactcttg caagaactca gtatcttcag gacagcacca aggggggatgt 17280  
 tgctaaacca ttcattgagaa atccaccccc atgatcaagt cacctcccac caggcctcac 17340  
 ctccaacatt ggggattaca gtgcaacaca tgaatttaa aggggacaac atccaaactg 17400  
 tatcaacctt gctgtacccc tcagcctcat tttataggca acaattgaat atattggttt 17460  
 tataaagggtt tgatattgaa agattcatta ggagtggatt ttaggacttg gggaatgact 17520  
 cagagaagaa aatagtgcatt gatagtataa gtctatctga ttgatgagta actggaaatc 17580  
 cttccaaaac ataatgcttc agtgtctgca gaattgtttc atttccatgt ttatgtattt 17640  
 cttattgttt ccttgtttat ccatagggtgc ttaatTTTTT tttaatctga atgcattatg 17700  
 ataactctta aataattatt tcagaggaat atctgaaata ttcagtgttc ttctagcatg 17760  
 gcagtatttt aaaaatcatt atgagcttaa attcactactg atttaaaca cttctagatt 17820  
 tttttgaata tcaatagcag agggtagttt taaatatttc acgagcagaa ttaattaaat 17880  
 ttctctgtgca attttatttt ttatagacaa actcgtcact tcttaaaatc ttttaaaaat 17940  
 gtcttggttaa tacagccttg gaatatgatg gtattgaaat gagatcttaa gggaaaaaaa 18000  
 actccaacgg gtttttttgt tgttgttgtt gagatggagt cttgctctgt caccaggct 18060  
 ggagtgcagt ggcattatct cagctcactg caacttctgc ctcccagatt caagcaattc 18120  
 tcctacctca gcctcccag taactgggat tataggcgcg caccaccacg cccagctaat 18180  
 ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttggg caggctgttc tcgaactcct 18240  
 gacctcgtga tccgcccgc tggcctccc aaagtgtgg gattacaggc atgagccacc 18300  
 atgccccgcc aaaaactcca acttttagag gcctatttac agcacttgc ccatatttgt 18360  
 tcacactttt tctgtatgtg tgttgtgaat tataaatctg gcttttcta caaatgtggc 18420  
 ttttctgtg tagtcatcat taagcatgat tctaagaagt agctcaaaat ctctaagac 18480  
 caaaaaccac aaaaaacaaa aaaaaaaca acaaaaacc aaaaccagaa aagggataca 18540  
 ttttgcagaa taatttatat tttcttctct tcatggcatc agttttctca ggagttcttt 18600  
 ttttgagatg gagtctccct ctgtcaccca ggctgtatg cagtgggtgc atctgcaagc 18660  
 tccgcctccc gggttcaagc cattctcctg cctcagcctc cggagttagct gggactacag 18720  
 gtgcccgcc caacgcccgg ctattttttt ttttgtattt tcagtagaga cggggtttca 18780  
 ccgtgttagc caggatggtc tcgatctcct gacctgtga tccacctgcc tcggcctccc 18840  
 aaagtgtgg gattacaggc gtgagccacc gcaccgggc tcaggaggtc ttttaagctt 18900  
 ttgcctgtca tgtgtgtact tctgacgtg gcccaggta aatgattac atttgacttc 18960  
 ggtagccctt aatgtatgg ctgttcttaa tcttttctaa agcctaaaag ttgaattagt 19020  
 attcatotta gatttcttgt ttottaagt aaagaatcat gacattgtat taaaatatct 19080  
 tatttgcatt tattttatat actgttttaa taggcagtag tagtatacaa gctttgacca 19140

ES 2 535 178 T3

aatgtctctt catataaaaa attcaagtga ataaaaacag tcatttataa atgacattag 19200  
tcaaaggggc aaaaaagatt acaaatgctt attgtgattg acagaacttg cttaacatat 19260  
tagggttctc tagaaggaca gaactaatag gatatatata tgagtttatt aaatattaac 19320  
ttaaattgatc acaaggtccc acaataggct gtctgcaagc ttgaggagca aggagagcca 19380  
gttcaagtct caaaactgaa gaacttgag tctgatgttc aagggcagga agcgtcttgg 19440  
ctaaccacc catcttgcc tcccaaagt ctaggattac aggcgtgagc ccccgctcct 19500  
gggtgtacac atttttaata tctttatagt attctgttg ctaagttgcc acaatttatc 19560  
agacccttt aatgtcatta atttttccc aatatttaga cttgtttcat agaattatta 19620  
gatatgcatg ctactactcc tgccttttt caaaggacaa ttattagata ttcttgtttt 19680  
cctcatatct ttgccaacac tgggtattgg cattcttctt gtttaccagt cagctaagga 19740  
agctaaggaa gaaacaatat ctcatTTTT tgtacttttc tctgattctt aattatggtg 19800  
accatgtttt catttctttt gtgaaatgcc tatttatggt cattttcata ttaaattgta 19860  
agagttactt gtataaatat attaaacctt tgtagtatat attttttctg ttttttttta 19920  
aagttttgat tatagtgttt ataatatgca gtcaaattta cccatctttt atttctctta 19980  
tcatttttca cttagatgtg gggtttagaa aggaggtaca taatgtgaca gagtttttgg 20040  
tatagaaata actgacatag ttagatataa aacataccaa ggaaatagtc ggaaatgtcc 20100  
aattcgaat gtgtaaggag accagtaaga aatcatgaa gaacagctaa cagcagtaat 20160  
ttttaaaggt gtatttaca acacttgaaa atgtttatgt agtttaaagg aatgattcaa 20220  
atataagag aagcgtaca taaaaatgaa ataaaggcat atatatagtc attgtgtaga 20280  
tggttttcta gtaacagtta taccaagttt gaaatgattt ttaggctttg ttatgccaac 20340  
ttttaggagt tttcttttta aacttttga gcttatgttt catcatggcc aatttttata 20400  
aattttccct atatgctcaa aacatttttt tagtgggaagg ttttaatacg tctgtaattt 20460  
ctccgggtgc ttaaaaataa ttagtttgtg gagctctttg tgtattggag ataccatctt 20520  
cttgtttgat atatttgtat atgtattaag taagaactgg ataaagaagg tggttgggat 20580  
atgtataaat atcaggtaag aacttgataa cgtattgggt ggtttgcata tgaaaagttg 20640  
ccctcactgt caggttcttt cctgtttcta ggaattggct agccctggaa ggactgcccc 20700  
ttccagggtc agcaaattcc caagatagca aagcatcaaa aatacagaat aaaaagacat 20760  
gcttagtaga gtatatagaa atacaattgg ttttgtttat tttgtgatgt atcctgtgat 20820  
actggtaaat tcatttataa gttctagtaa ttttttgta gaatcctcag catttttgat 20880  
aaatacaatc atgtctgcaa ataaaaagtt ttatttcttt catttcaatc tctatgtctt 20940  
ttatttcatt ttcttaccag attgcattag gtagaacctc cagtgtttaa tagaaatggt 21000  
gggtgtgagc atcctttcct tgttctgat tttatggaga aagcattcaa tatgtaatca 21060  
ttaagtaata gaaggttgtt tgtagatgat ctttatttta ttgaggaaat tcccttcttt 21120

ES 2 535 178 T3

ttctaattta tttccagaaa ttttatcatg aattgggtgtt gacttttgtc aaatgctttt 21180  
 cctgcaacaa ttgggacgat cttatggttt tgctccatta ttctgttaat gaggtaaatt 21240  
 gcattgattc attttcaaat gtcaaagcaa ccagtatgac tggaaataaaa cccacttggg 21300  
 gatgggtgtc tgaccttttt atatgctcct ggttctatgt tctattattt tgttatgttc 21360  
 atgagaaaca tttgcctgta attttttttt tttttatga tgtgtttttg ccagggtttg 21420  
 gtattaggat aattctggcc acataaaaatg atttggaaat tatttctgcc cctctgtttt 21480  
 ctgtaagagt ttatacagaa ttgggtactat tttttcetta aatagttgac agactttccc 21540  
 agggaagtca ctttgcccaa gagttttctt tgtgggtatg tttttaatga agaattcaat 21600  
 ttattgaaga gatatgatac tattcaaggt ttctgtttct tcctatgtca gttttggtaa 21660  
 tttttgtctt tcaaggaatt tgttcatcaa atctaacttg ttaaagtcac tggcatgaag 21720  
 ttgctcctat ctttttatat ccacttactg tttataaaaat ctgtagcgat atcctgcttt 21780  
 ttttcatca tatggggcac atattggtaa tatgtgttct tttctgtttg taaattgatc 21840  
 atcttagagg tttatcaact ttttaaatct tttctaaaaa caaagtttg gtttgattga 21900  
 ttttctttat tgttttatat attattaatt tttgttcttt attctttctt cactctctgg 21960  
 ttttgtttc tagctaccta ggaagcttac ataattaatt tcatatcttt cttcttttcc 22020  
 atcataagca tttatagcta tacattctct ctaaccacta ttttagctgt attccccaa 22080  
 attttattgt ttattatcat tcagggtgaa ataatttctg atttcccttt taatttcttc 22140  
 ttcgaacctg ggattattha gaactatgtt aattttgcaa tactgggaga ttttctagat 22200  
 agttttttga tttttatthc taattcaatt ttgctatggc caagaatata attcatatta 22260  
 attcagtctt ttcaaatggt tgagaattgg tttatggacc aacctatggt ataacttagt 22320  
 gaatgttctg tgagcaactg aaaaggatgt atgttctgca gttgttgggc attgtgttct 22380  
 gtaaatgtca gttatattta gttgggtgat gtttaggtct tcattatttt tactgattaa 22440  
 aaaaattttt tttgttaatt cctgagaaat gagtattgaa attttttagtg taatagttgt 22500  
 tttatttccc tctttacatt tttgcttcat gtaattggaa actattattg tgtgcatata 22560  
 tatttaagaa gagtaattta taaatcttct atgattagtg tttttatggt ctgcttacia 22620  
 gaggtcacat tggctctgtt tccatcttaa attaatattt gtgtaccgta tgaagtagat 22680  
 agaagttaag gttatttttt gccccatag aataaccagt tgactaagcc acatgttttg 22740  
 aatgaccaa ttttcttca ctgaaatgca atggcacatc tgttccaaat taggtaactg 22800  
 tatgtgagta tgtttttttg gactctattc tgttccattt gtctatttgt tcatttttgt 22860  
 gctaatacca atctgcttgt tctatcttta tgataaatct tgatgtctga taatataaat 22920  
 ctttagtttg ctcttcaaga ttgttttggc tattgtaaat cttttgtttt tcacagactt 22980  
 taggatcaac ttgtaaattt ccacaaaaac tgctaggatt ttaattggaa gtgggttgaa 23040

ES 2 535 178 T3

tctatagatt aatttgaaa agaaccgaca tctgaacat actgagttt tctgtattct 23100  
tatatcagca tggctatcc ctctcttatt tagctagcat ttatTTTTTg tagaaatggt 23160  
ttacagtttt tattgcacag tttttacaga tttttccata gatgtattcc taggtatttg 23220  
atTTTTTggt actattgtaa atgatactat ttttaaagt tcatttaaaa aattgTTTgc 23280  
ttctgacata cagaaatgca gttgattttt atatattggt cttgcatctt gtgactttgc 23340  
taaattcact cagtgattgg tagattcttt taaatttctt acatatacag acatgtcctc 23400  
tatgaatact gacaatttta ctatccttt ctaatcatca taacttttat ttagttttct 23460  
tgccttattg cactagccac aatgtccact atggtattga atagaaatca tgattttaga 23520  
catgattggt acgtTTTTga actctagaag aacaagatca atattttacc attaggtata 23580  
ttgTTTTttt actgttacc tttatcagag tgaggaagt tgcttttatt cctagtttga 23640  
gattttaaaa tcatgaacat tggttaaatt ttattaggag tagtttctgc atctattgaa 23700  
atgatcatat ggtgtgtttt ctctattggt taataatgta aaatatattg actattttaa 23760  
aaatTTTTt ctaaattaca taaaaatgt atatatggtg tacaacatga cattttgtta 23820  
tatgtataca ttgcagaatg gcaaatcag tctaattaac atatgtatca cctcacatac 23880  
ttatcttttg tggtgagaac acttaaaatc tactcttagc aattttcaag tatacgatat 23940  
attgttattg gtaatcacca tgatgtacaa tagatctctt cagtttactc ctctatcta 24000  
acagaaattt cgtatccttt gaccaacgtc tcccattcct cctaattgga ccctcagcct 24060  
ctggttaactg ctgttctact tactctctgc ttctatgatt tctacttttt tagattctat 24120  
ggatcagtga gatcatacag ttttgtcttt ctgtgcctag ctttatttca cttaataata 24180  
tgtcttcag gttcatccat gttgtgttaa atgacaagat tttctctttt ttttaaggct 24240  
gaattatatt ctattgtgta catatgctgt attttcttta tcagttcatc tgttgatgga 24300  
cacttaggtt gattctttat ctggctatt aagaataatg ctgcaatgag catgggagtg 24360  
tagatattgc ttgacatat ttttttagt tccaataccc agaagtggga ttgctaaatc 24420  
atatggtagt tccattttaa tttttgagg aacctccatt cattttccat agtgactgta 24480  
aaaatttaca ttttccacc aagagtatac aagagtttct ttttctccac aactcacca 24540  
atgcttgta tccttatatc tttttgataa ggctcattgt aacaggcatg aggtgagatc 24600  
tcactatggt ttaatttgc atttagtgat gttgaacgtt ttttcatgaa catgttggcc 24660  
atttacatat tgtctttttt tttttttttt gagacagagt cttgctctgt tgcctaggct 24720  
gaagtgcagt ggtgtgatca tagctcactg cagccttgac ctcccaagcg caagtgatcc 24780  
tcctccttca gcctcttgag tagttgggac tgcaggcatg tgccagcatg cctggctaata 24840  
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttttag gtacagggtc 24900  
tcaactgtgt gccaggctg gtcttgaact cctggctca agtaatctc ccacttggc 24960  
ctcccaaagt tttgggatta cagggttgag ccaactgcacc cagtctgtat tgtcctttga 25020

ES 2 535 178 T3

ggaatatctg ttccggtcct ttgccattt ttaaatacagg ttatttgttt tcttgctttt 25080  
 gagttgtttg catttcttat ctattttgga tattaactcc ttatcatatg gatggcttga 25140  
 aaataatctt tcctgtttta taggttgctc cttcactctg ttaattgttt cccttgctgt 25200  
 gtacaagttt ttaaatactgg tataatgatt gattttctaaa tgtaactttt gcaactcctgg 25260  
 gggtaaattc atttggcaaa gatgtattct tttaaagtgt tattggattt aatttgctag 25320  
 tattttgttt agcatttttt tccaaatag tttatgagag agattccagt gtaatttttt 25380  
 tccttttcat gtccttacct atttgggtat catgtttata ctctcatttt aagaatgtgg 25440  
 gtaagtgttt tttattttct atttcctgag agagtttgta taagctcaat gtttcttctc 25500  
 cagacatttg gaaaaattta ccagcaaagt cactgggcat tacattttct atgtggaaaa 25560  
 gttttaaata gtatattctg agggctctgt tctgttccat tgatctatat ctctgttttg 25620  
 ctaccagtac catgctgttt tggttactgt agcctttag tatagtttga agtcaggtag 25680  
 cgtgatgcct ccagctttgt tcttttggct taggattgac ctggcgatgc aggcctcttt 25740  
 ttggttccat atgaacttta aagtagtttt ttccaattct gtgaagaaag tcattggtag 25800  
 cttgatgggg atggcattga atctataaat gacctgggc agtatggcca ttttcacgat 25860  
 attgattctt cctaccatg agcatggaat gttcttccat ttgtttgtat cctcttttat 25920  
 ttcatgagc agtggtttgt agttctcctt gaagaggctc ttcacatccc ttgtaagttg 25980  
 gattcctagg tattttattc tctttgaagc aattgtgaac gggagttcac tcatgatttg 26040  
 gctctctgtg tgttattggt gtataagaat gcttgtgatt tttgtacatt gattttgtat 26100  
 gctgagactt tgctgaagtt gcttatcagc ttaaggagat tttgggctga gacaatgggg 26160  
 tttcttagat atacaatcat ggtatattca atttttaaat tactgtattt gtttgttctc 26220  
 atattgctat aaagagctat ctgagactgg gtagttttta aagaaaagtt gtttaattga 26280  
 ctcatggttc cataggctgt acacaaggca tggctgggaa ggcctcagga aatttacaat 26340  
 catggtagaa ggtgaagggg aaaaaagtac atcttcatac agcaacagga aagagacagc 26400  
 aaaggacgac atgctgcaaa aatttaaata accagatctc atgcaaacctc actcactatc 26460  
 atgagactag caaagcgtaa atccatccca tgaccagtc acctctcacc aggccactcc 26520  
 tctaactctg aagatcataa ttcaacatga gatttgggtg gggacacaga accaaacct 26580  
 atcaattata tatagaatta ttcaaatttt atatttcttc ttgtgctagt ttaggtaaat 26640  
 tgttttaaaa ggaacttcat ttgtttttaa attggagaat attcctgttg tcttttacct 26700  
 gtttcaatat tgtaagctct ggtaataatg tctacttttt aattcccgat attgataatt 26760  
 tatgttttat cttctttttt tcttgatcag tctttctagt gttttatcaa ttttaatgct 26820  
 tttaaaaagc caacgtttta ctttgctttt ctttatttta tttttatttt tctctgattt 26880  
 ctgctcttaa gtactttcat ttttatgggt tttggcttaa tttgttgcaa cttcttgaaa 26940

ES 2 535 178 T3

tgaaaattta ttaataaca ttgttcagcc tttcttctcg tcttgtgtat gaatttaaga 27000  
 ttatgaatat cttagtatac acttttactg cgttttactc attttcatta ttgattcaaa 27060  
 gtatttttaa agttattctt tgtaccatgg gttctatgaa aatataattga ttaatttaca 27120  
 aatataatgcg ggtttctagt tatttttctg tatatgctgt ggtacttttg tcagtggtta 27180  
 tattttccat aagagatfff taatttaggt gccattggca aatttccatt aattcaaatg 27240  
 cagaacttca catTTTTcaa tgcatacgtg agTTTTTTTT gttgaggtat taagaatagc 27300  
 ataaatttat aaaatattaa gtaatcattg aatgcaaaat atgtcctatt ttgcaactta 27360  
 atatactttt attaggttga cgctaaagta attgcgtttt ttactcatac ttaaatggca 27420  
 aaaaccacaa ttacttttgc accagtctaa taatgagaat tattattatt attatattgt 27480  
 cttttttttt ttggagtgg agtctcactc tgtcaccag gctgaactgc agtgggtgga 27540  
 tatctgagcc ttggctcact gcaatctctg cctcccaggt tcaagcaatt ctctatctc 27600  
 agcctcccaa gtagctggga ttacaggcac gtgccaccac gcctggctaa tttttgtgtt 27660  
 ttactgagag aacagggctc cactacattg gcctggctgg cctggaattc ctgacctcaa 27720  
 atgatcccc cgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcattgagc caccgcgct 27780  
 ggccctaata atgagaattc ttatcaaact gtttacacag aataacatga gtgggtaatg 27840  
 gtgaagctga gtttcacatt tttatgcgat attcttcagt gttgctattt gttcagtact 27900  
 ttaagaatt atataaattt tttatagtct atacataaag tcaatattat gggccccaaa 27960  
 tataataaat gtttgcttgt tccattgttt atgTTTTgaa taaaaattat attttgtatg 28020  
 atttcattaa taatttgttg agaattttat ggccaaacat gtgggtctact ttctaaaata 28080  
 ttccagcttc atttgaaaag gatatgcatt cttcagttgt taggtgtttg cttttgattg 28140  
 cttgtatttc tcagtcaaat gtaggaagtg gagattaaga aaagggctgg cacttttggg 28200  
 gattgaggag gagaaagtat gagatagttg tcttggatag tggagagta aatgttctaa 28260  
 agaaatataa aatgatagtt gagcagcact aagggcccat ttgagtatga atctaaagag 28320  
 ggaccaatct gaatgcatgt gttttcatca gtgattttta tatgtgtggg taaaagctct 28380  
 gagtagacag agataaactg aactctttta gagtttcttt gttatctttg gtgtttggat 28440  
 ctttgctttt gatttgtatc ggtacagttt ttaaaaaatt aaatgttatc tcctctcagc 28500  
 agatcttttt aacatgaacc cagcatcttt aacaccaata aaatttcttc tattattttt 28560  
 cttccctgtg ttttcattcg tcctccatct agagcttctc tttagaattg tactccctgg 28620  
 attgatcctc ttatttctta cttttatgct cataatattt ttttctttct gtctgtctct 28680  
 ttctctttct gagtctagga cctgggagtt tgtcttgact gtcttccaaa ttatgagttt 28740  
 gatcctttga gtcgtattat tcaactcttt cactgaattg tcatctatct ctttttcttt 28800  
 aatgataga gaatttatta tgcacagcca cttgcaact ttaacaagta tgattagagc 28860  
 agcattttct ataacagcaa cacataagtt ggaacaacac aaatcttaa ataaactggaa 28920

ES 2 535 178 T3

tggatgagca aattgggtgg tccgaggctc agacatcagc aggtgttaaa cacctgtggg 28980  
 aaaggagaga acgatccatt tatttatttc tataggaaat gcaaaagagg caaaattaag 29040  
 aaaaatactg cttcatgata aagaataaag ccgtgaagaa tatccacaaa attgtgtata 29100  
 gtggctacat ctgatacaga atggaaacag ccaggataga gcagcacagg aacactatga 29160  
 aatgcccagg ctgtcttcat tactagtcag gatttttttt ttttaattttg taaactttat 29220  
 ttattctctg ctcccttttc ataatctagt gatgctttat gttttcaaaa tattcttaaa 29280  
 tctctctgag aataccgaga aagattttaa accaagttaa ctccctgca ttatctgttt 29340  
 cttctggggg cagttgtttt ctgggtccatt ttggctctac tctttttatt ctacaacccc 29400  
 tgccccatcc ccacctaac tgtaataatc cttgataatc attgcatatt tatgcttttt 29460  
 atgtgtgtgc agacaactgt ttttatgctt atagatgcct tcctctgtgt attttttttc 29520  
 ttcagttaa atttttttt tttgcagtca cagtcttget ctggtgcca ggctggagtg 29580  
 aagtgtgccc aacctagctc actgcaggct caaactcata agcttaagcc gtcctcccat 29640  
 ttcagcctcc caagtagcta gtactacagg tgcacactac atgctggcta attttttagat 29700  
 ttcttttttg tagagacagg gtctcgcaat gttgccgggg ctagtcttga gctccaggct 29760  
 caaacgatcc tctcgcttg gacttccaaa ttgctgggat tggaggcatg agccatcgca 29820  
 cctagcctat gtatgtttta aatagagtct atttctctta ctctgtcatt ctagtctat 29880  
 ctacttttga tcttctgga attactgtaa atttctgatt tgetgatagc accttttctt 29940  
 atttgtcgga gccgccatga attcgtttat ataaactttt aattttactc ctttttagcta 30000  
 ctgttgttac ctgttttact tttatatcta ttttaagccc taccatacac cgttattatt 30060  
 catgcttta acaattgtca gttgtctttt ttttttttag acggagtctc gctctgtcgc 30120  
 ccaggctgga gtgcagtaaa catgacctcc gttgcaacct ctgccttcgg ggttcaagca 30180  
 attctcctgc ctcagcctcc cgtgtagctg ggattacagg cgtgtaccac tatgcccggc 30240  
 taatttttat attttttagta cagacagggt ttcaccatgt tggccagggt ggtctogaac 30300  
 tcctgacctc aggtgattca cccgcctcgg cctcccaaat gctgggatta caggcgtggg 30360  
 ccaccacgcc tggetgtcag ttgcctttta atacatttaa taaatggaag aagaataata 30420  
 ttataattaa tcacatattt actatttttg agctcttcat tcctttctgt aaacctgagt 30480  
 ttacatgtaa ttttccctt aatccacatg attttcttta tcagttcttg agtgtgagtt 30540  
 tgttggtgat gtactctctc agcatccatt tatctgaaaa catatttgtt ttgccttgaa 30600  
 ttttgaaaat tottattttt tataatacaa cagatccagt agtatgagaa ttatttttca 30660  
 ggattgtaga attctggggt gacagctttc cccctctccc taccagtaact ttgtcttctg 30720  
 gcctccatta cttctgaagc gatgtcagtt ctatttcttg tcttggttct cctgtatgta 30780  
 tgtgactgct ttttaagatta tctttttgct tttggttttt agcagtttgg ctataatgtg 30840

ES 2 535 178 T3

acttaagtat ggatttgat agattggatt cagatgaact ttttggatcg gtggtttgat 30900  
 ttttttaaac aaacttggaa aacatttagc cagtattttt tcaagtattt cctctgttcc 30960  
 acttataatgt atcagacttt gttactcttg ttgttcagtg gtgtgatcac ggctttctgc 31020  
 agcctcaaac tcctgagcgc aagtaatcct cctacctcag cctcccaagt agctgggact 31080  
 acgggcacag agcaccatgc ccagcaaatt aaaaaaaaaa tttttttag agatggggtc 31140  
 ttgctatggt gccagggcta gtcttgaact cctggactca agcaatcctc ctgccttggc 31200  
 ctcccaaaat gttgggatta aaggcatgag ccatgactcc tggcctagat ttcttgatat 31260  
 tgtagagttt acatatggct tctttatctt catgcattat attaatTTTT tactgtaaat 31320  
 tctattacat atgtatcata gtaaacaaag tctttaaaat aaattctaata atttgggtct 31380  
 gctttgggtc catttctatt atatatatc ttcttttcat gtttaataag tttcagctga 31440  
 ctattgtaca ttgtgggtga tacagtgtag aaactccgga tgatgtggat ttcaatcttt 31500  
 ctctgaagta atgagttttg ttctagcagg cagttaaatt tactagcaga ccaacttgat 31560  
 cctgcccagg ctgtgtttta ggctttgttg ggacaggctt atttcagttt tgccattact 31620  
 tctggtaagt ggctcttatt cttcaagtgt ggcttttctg gcgtttcagt ggaaagcctg 31680  
 agatatttac cagtccctc taacactaaa tcctgactct ccaggaccag atagctgttg 31740  
 aaatctcttc ccagttcttt cagatttcta gctattgcct gtccctgggc ttcgattttc 31800  
 atcctatgga tgggaattca ggagtcaggc cccactgact cccattttcc tgagatttct 31860  
 gccctcaatt tttggctttt ctagcagctc caaacttcat tctctgatac tttcaccag 31920  
 taagactgca gctttttaca agagctctgt cccctcctct ggcccctgcc tgtacacaac 31980  
 agactgtgta tgtagttgtc tcaggatgga agaagagtaa gtatgggcct cattcagtg 32040  
 attcccttc tttcaagggt catatcccc cgatttgat ctgcttttgt ttctttgaca 32100  
 atgccttcaa atggtgtttt tataaatata tattttttaa aagtttataa ttgtcgtcat 32160  
 caggaacatt agtgtagtat aaactactct ctcatatca aaaatctgta tgttaaaaaat 32220  
 tacttaaaat tgttgttatt tatcatttcc ttggtgtttg gggcagaagg gaatgcacat 32280  
 gatttttctg aacttctcat taaggaggc aaccagcct tggctctggag atcccgaat 32340  
 tataccgtat gtataataaa ataattattt tgttattttt atgagcatag cattaataaa 32400  
 ttaaatattt agtaagattt gtatctcagg atttttctac ctgctaagaa tagatcgttt 32460  
 gacaaggcag atgaggttct ttgttgaatt ataaggtatt gaagcctata atttagtagt 32520  
 ggaaagagca catagcaaga gttgtatgat gaggttggag aggtaagcag caaacagata 32580  
 atggaatttt agtctaaaca ttcgtaaaat atgagggtgg ctccctgtggg agattagggt 32640  
 attgggagc aaagtagact tagggaaaat agttaggagg acattgcaat agttcaggag 32700  
 agaaataata gctgtttagt gtatgatggt agttgtggaa aaaaaagcca atggatggat 32760  
 ttgaaatata gtttggaaat aaaactatca gtacatattg atggactgga tataggggtg 32820

ES 2 535 178 T3

aaaaaagaga agaataaagg ttgaccaaat tctttattat ctcaaagtat gaaagcttgt 32880  
taagacctct tttctgtttg tttttctttt ctgtctcaat aagaaaacaa cccaaagcac 32940  
tttttttcta ataacttata tcttcttctt ttgtgataaa aaaaaatagg agtggctctt 33000  
agagtacaat acaaaattct tttacatttc acctcaccat atttaggttt accaaagtag 33060  
tataggaata attgtaggaa aaacatagta tatctacttg gactataaaa ttttgggata 33120  
ctaaagaaag taaatcaaaa tggttatata ttgcaataga atgcaaaatc acatggatat 33180  
taaaggtaaa cttttaaagtg tttttatata tcttggcttc ttcttcagac cactccattg 33240  
ccttttggga ctttctgtg gaaaagtga gaagcactga cctatctgaa ccttccaatc 33300  
cagccaaact tgtctctact ttgttccagg aacatgctgt gtacattcct ctttccatgt 33360  
tttgcattgt tttctccctg ccaataatgc cctgtttttc attacttgtc aaaattctat 33420  
tttcttttta aggtccagcc tatgttttaa ttgttgtgtg aaacttctaa aacttttctt 33480  
tgttttaaat aattatgata attttcttct tgtcattttg tagcacttaa tttttaaata 33540  
ttattttgta cttagatgat gtgtaattta ctataaatca tagattttta agaattggga 33600  
ggaacagcgg aaatttaatt aagtaatttt attatacaag tgaggaagct gagattcatt 33660  
tgtcatgtaa gtagtttgca ataagaaagg atgaaactta tttttaggtc tcttggctcc 33720  
caggttagta atttttctaa tctactgcat taacttctca tgtatattta ttgatctgaa 33780  
aagtgtgtc tcttagaatt atgtagtata tgagtaaagt ttgaaaatat gaacttttaa 33840  
aatgtgatat ttgaggtact ggtttttgag tgtatgtgta cagttgatta aaatttatta 33900  
taacttttat ttactcttc tttttttttt tttttttttc gtagagacag gttctcacta 33960  
tgttcccag gctggacttg aactcctgag cttaaagtgat cctctcacct tggcttccca 34020  
gagtgccaggg attacaggtg tgagccactg taccagcct cttatttact ctttattcaa 34080  
cagatttggt aatcaacaca tgttgaccag acttaattac agcttttata tactcttcat 34140  
ttattcaaca actttcatgt gtcagagagt atcctaggca ctgagtgag tagtaaataa 34200  
tacattaagg ttcttacctt caagaaactt tcattctagt ggtacaagac aatgagcaaa 34260  
atcataatct aatctatggt gggaaaatat cagaacagct gtggccactt gagtggttgg 34320  
agcagggact gatggagaag gagcatggaa gaactttctg ggatgctgat aatttcttag 34380  
ggctttgggt tacataggta tatgcagtgt ccaaacttat tgactggtac acttaagatt 34440  
tgtgcatttg attgtattta ggagggaaaa tcctgtaaaa ctagaataga tgtaacttat 34500  
atgagagtta taaatgacaa tatgttaaac acccatgaaa ctaccacca cccaggaac 34560  
tagaatgttg ccagcaattt gcacctacat atgtgtttct ccctagctat tctcctgtct 34620  
atcttgacaga agtaaccatt gtgtattgta ttttgggatt aacatttctt tgatttttta 34680  
ttttttttt gggggggcgg ggggagattt gttaacaca tgtatatgcc taaacaatgt 34740

ES 2 535 178 T3

actattcagt ttgcttggt ttgaaatth agaaaaacgg tattttacag cttacagttt 34800  
tctataatth actgcttttg caacattgta tttttaagat ttatccatgt tgcataaagc 34860  
tatagttcat ttattttaac aactgaggaa cagattctgt agtataaatg cacaaaagta 34920  
tttacctatt ttcctgatag tttgggttgt ttgcagtttt tgccattgga agctgaggcg 34980  
caatgaatat tcttghtaatg tgtctcttgg tgtaaatatg catgaagttt gtaactagac 35040  
gtagaattgt agcagttctc agaacgtggt ctctagagga tgcttgggta tcctaaaaac 35100  
ctattcaaggt gtttaatgaa attaaaatga ttttcataat aatgccaaaga tghtaaatgt 35160  
ctttttcatt gagtggacat atgcacaaat ggtacagaag taatagttag ttaaaccggct 35220  
ggcaccttag cacaaatcaa agcagtaatg ctgggtttag ttgtgatcat tgtattcttt 35280  
ttctttttct tttctttttt ttttttttga gacaaggtct cactttgtta cttaggttgg 35340  
agtgcagtggt catgagcaca atcactgtct actgctgctt cggctctctg ggctcaagtg 35400  
atcctattgt tttctttctc gtcattgtact tccaggaaaa gaaaaaagcc aattcagagtc 35460  
acttattctt ttgattcttt ttcgttagcaa agcatcaatg cattttctaa atgattgaat 35520  
tcatttaaat tcgggaaaca tttactgagt gcctatggaa ttctgggata tgagtgtatg 35580  
tttaaggcag tgtgatttcc agttaccatc ctttctgttc taaacacgat tgtgtcatat 35640  
taaaatataa aaagagtaaa aaatatcctg aataaaaaata gatcaagctg tacatatata 35700  
tagattataa gtgcaaaaata ctgagtgtgg ttaaagccta tgctatgctt gctgggtttc 35760  
ctgtacagaa gtaggcattg gagacagttt tgctcttgtg gtacaacatg gatgactaga 35820  
ggcaggtcca ggatgttact tttactgcca gcctgcctt ccctccaaat agactattgg 35880  
aaggggaacc tcccgccaaa cgtgcctac tgctatagtg ttggataagt tgcaagctta 35940  
ggaagatgag atgacatgat ttaggaactt caggatgaag tgaagtatct cctgccttgt 36000  
gactgactgg atctgcatcg tatcagatac ctctcaagg caggaattht aacctgctgt 36060  
tataagacct ggttctatat atggatagcc caggtaggct aagttgtggc agccacagat 36120  
tgttagatga ggagggacac cacagactgt gtatgtgtgt gtgttgaggg caaggtgagg 36180  
tgaggaatgg tgcaatgagc ctgcaaacca aattgcaaaa tatatgaaga aatgtagtgc 36240  
taagaaaaat agtcaacaaa attaaaaatt gaaaaatgaa ttttttctg ataaaattta 36300  
aaaatgtaag taaacctcta atggaagtgt aacacacaaa caggaaagta tgctactcat 36360  
aaatgcacag cttaaacaaat tttcataaag tgaacacacc tttgttaacc actactaga 36420  
tcaagaaata gagtatcacc tgaattactg gcaggaggca cccagaggt ctccctgtac 36480  
ctctgcccag ttattctcca tgcctccca ctatcccaac cctgccaaagc taaccattat 36540  
cctaacttht tttcacatg agaagaaat ggaaggatat ggaagtgagc ttgagaggcc 36600  
tccatggtca gtgaacagtt ctgctaaaat aatttagagg gaatacaaaa gaagttagcat 36660  
ttgacggcat agtagctgag aatttcctag aatagaaaaa agacatgaat ctttagatta 36720

ES 2 535 178 T3

aaagtatgta gtcatttttg atcaagataa agaagaatct acatcaaaaac ctttccaaaa 36780  
atattgcaga acattgctgc taatgcaaac aagttttaa ctacttgagg gaaagccatg 36840  
acatgtagga gtgatagcag acttcatatt tatgttaata gataccacaa aacaatgcag 36900  
taatatcttt aaagttctgg ggaaagaaaa ttataaatag gattttgaga gtgagggcaa 36960  
catatttttt tcaaagacta caacttaaaa acccacagag cccactgaa aggtctacta 37020  
aaagatacat ttcagcagga aaaagtgagt cctgaaggaa gacccaaaaac aatgatgagc 37080  
acaaaacaat ccaaagtcag tggtagggcac aaactgataa aattctagca aatttactcc 37140  
ttaatgctaa gaacttcggt taaattaact ttctatcttt tcagaaaacc aactcttaga 37200  
tttgtaaatc ttttccatca tttttatagt ttctatgtca tttatttctg ctgtgaactt 37260  
cattttttcc ttccttctgt tagccttggg ctttgttctt ctttttctag ttccttgagg 37320  
tgtaatgtaa tgttgtttga catctttctt cctttttgat gtaggtattt attgctataa 37380  
acttccctct tataactgct tttgctgcat ttaatactga ctataataag atacgatgta 37440  
atagatttca aggaattatg tatttttgaa taattaatt ctttaaagtt gcatatccag 37500  
ttgcagatga acttcaaaaa tcttgcagtt ttatatctgt tacagtaatt gccaggtttt 37560  
gttgttgttg ttttgataca ttagaagttc tagaattggt atatoctctt gatgaattaa 37620  
tccctttatc attctagaat taccttgtct ctttactggt tgtgacttaa agtctgttgt 37680  
atctgatata cctttgcatg gaatatcttt ttctatccct ttaacttcag tctatgtgta 37740  
tctttaaagg tgagatgagg ttttgtaagt ggcagtagt tgggtcatgt tttttagtcc 37800  
atthagccat tctctatctt ttaagtggaa agtttaatct atttacatc aagtttattc 37860  
ttgatatgtg aaggcttatt cctgtcattt tattaattga tttctggttg ttctgtaggt 37920  
cctttgttct tttctttctc tcatattggt tagcattgtg gtttgttgggt tttctatagt 37980  
gataacattt gaatcctttc ttgtctgtgt gtgtttgctt taccagtggg tttgatactt 38040  
tcgtcatctg tttttcataa tggtagtaat tgccttttt gtttgtttgt ttgtttcttt 38100  
tttgagacag ggttttgctc ttgttctgtc ctccaggctg gagtgcagtg gtgtgatcat 38160  
ggctcactgc agcctcgacc tccatggtct caggtagtcc ttctgcctca gcctctcagg 38220  
tagctgggac tacagaaaacc tgccaccatg cctggctaata tcttttgtat ttttctgtaga 38280  
catggggttt tgccatggtg tccaggctgc tcttgaactc ctgggctcaa gcagtctgcc 38340  
tgcctcagcc acccaaagtg ctaggattac aggcttgagc cactgtgcct ggctgacat 38400  
tgttctttga cttccatag tagaactccc tcaagcattt cttgtaggtc tggcttagta 38460  
gtgttgaatt cctcagcttt tgcctgcctc agaaaaacta tttttcttt gcttaatgaa 38520  
ggataatfff gctgggtata gtatccttga cttgcaggtt tttttcttcc agcacttttc 38580  
atatactggt ccattctctt cctggcctgt aatgattctg ctgagaaatc tgetgttagt 38640

ES 2 535 178 T3

ctgatggagc ttcccttaga agtgactaga ctcttttttc ttgctgtttt tagaattctc 38700  
tctttgtcct tgacaagctg ttgtctctga caacagttct ctctttgtct ttgacaaact 38760  
gttgacagtt tgactctaata gtgttggtga gaacctgttg gaattttgtc tttttgggga 38820  
tctctgagct tctgtatctg aatgtctaaa tctcttgata tacttgggta gttttcagct 38880  
attatctcat taaccaggtt ttctattcct ttgtatctt cattgtcttc tagaatactg 38940  
aaaattctaa tattagtttg ctttatggta tcccatatgt catgcaggct ttgttcattc 39000  
ttttttcttt atttttgtct aatggggta tttcagaaga cctgtcttca agttcagaaa 39060  
ttctttcttc gtagatgctc tagaatgtat tttttatttc attaaatgaa ttcttcagtt 39120  
tcagggttcc ttgttttctt tttaaatgat atctctctct ttggtaaatt tctcattgat 39180  
atcctgagtt gtttttctgg tttctttgta ttgtttatct gtatgcggtt gtatctccct 39240  
gagcttcttt aatatcatta ttttaattc tttttctggc atttcatgaa tttcttttgc 39300  
attggaatct ttggttagaa aattatcttg atcctttgga gatgtcatal tccctatgt 39360  
tcccatgttt ctgtgacct tacttctttg atatccacac atctgggtga atcatcactt 39420  
ccattttttt gaatttgctt tcatagggta ggactttttc ctgaagattt gactgggggtg 39480  
ttgttggtcc agggcacttt gggtttgaat ctgggtgcat gcagtagtgt agtctctgta 39540  
agattttttt tcctttgtaa acagcatcag tgggtgtctgt gatttcctca gtggcatagt 39600  
gtgtggttgt ggaggctgtg gtgaactttt gctggggatg gtgacaccag ctggactgat 39660  
cctcagtcct cagttgtggc agcagttgga caaccatgcc tgtacattag ccccagggtg 39720  
gcttacatta gtaatggtgt tagtgggtcc aggcagtcca atttttgggt ctccaggtga 39780  
cttgtttggg taccaggagt ggcagtgatg ggctgggcag ctgagtggtt ccacaggccc 39840  
ctgggcagtg agcatggcat gggttatgtc agtagcagtg gtaggagaac ctctggtgt 39900  
ccagttgtct gtgcttatgt cggcagtgac ggcgattggc tgggtaggca agtcctaaaa 39960  
cctgcaggtg gcaagtgtga gtgggaacca gctgtggtgg tagtggcagg ttgggtgggc 40020  
cacatcctca gacccccagg tggaatgctc agttgacact ggacgtggac aaactggtgc 40080  
gatcccaagg ccccagata acatgcttgg atacgtggga gtgggtgct gagctgggca 40140  
gggtgagagt atcctcaggc cctccagtg tgttagcagg tgctgtttgt ggtgggcagg 40200  
agcaggatga tttccaattt cctggtgga tgttcaggtg ggggcagcag tggctgtgct 40260  
gtgccctgat gctggggagg gtgcagttgc tgtcagtggt agcagttgta gggagtggc 40320  
taaggagtgt gcactgcagc tgcaggtgga ggctgtagat gtgatgaagc tgtactcagg 40380  
gtgcatgcaa atttgcattt tgacacctag cggcagcagc ctgcaatggt ggcagctgta 40440  
gggtgtagag cttgtcctca gggcacatac caatataatg cagcccttct gctgggagca 40500  
gtgggttat tgccaatggc ttgtgctttg gtcccagagg cggcagccag caatggaggt 40560  
gactgtcggg ggaggatgtc agtggggctc taggggtgtg gatatgcagg ggctgttggg 40620

ES 2 535 178 T3

ctccagggta ggaggcattc tgggtgtgggt tgggctttaa aaatggcacc gtgetgtage 40680  
 tgcttaggac tcaggggtgt gttggaccag cataagctcc ctctctaaag caatgtcatt 40740  
 gtgcagtctc caggcagctc cctatgttac tcccagggcc catgaaagt gacgggctct 40800  
 cttgtgtctg ggattgcagg agtttgcagt gaaaatgtgg gccactggga gtctctcaet 40860  
 tactctttcc ccacattgtg caggctctct aggcttctgg ctgatcctgg ctgagcaggc 40920  
 tgccccactt ccctctcctt ccttgcatta ggtgttttct atcaactctc tgttgaattt 40980  
 ccgtgttctc tcttagatga cctattcaaa gtgtgattat ctactcgeta ttttggttct 41040  
 tctttgtgga gcaggtgagt accagataac tctagtcaac cttctggacc cctcttcccc 41100  
 caatttgaga tctcttcttc tgttgtctgt aactgagttt aatgcttgtt tgttcatgtt 41160  
 aggattttat atcatcgtcc tcaattaggt tgttaactgg aattttataa tctttgtcca 41220  
 caggaagttt aaaatgtatg atttcttga ttgtgctttg tatgtagtaa tacacgatat 41280  
 ttatccagtt aatggatttg acagccattg ctgtcaagga gcagtccttc tttgtgtatg 41340  
 aaggtgctc tatcaatatt atttccattt gtaactttat ttatttatgt attcattttt 41400  
 gagacagggc cttgctgtgt caccagact ggagtgcggg ggagtgcgga ggtttgctgc 41460  
 agcctcatcc tcccaggtc aagcaattct tccgctccac tcccagagta gctaggacta 41520  
 caagtgcgtg ctgccacgcc cagctaattt ttttcttttg tatgtttttg tagagatgag 41580  
 gtttcacat gttgctgagg cttgtctcca acttctgggc tcaagctatc tgccccctc 41640  
 ggccccgcaa agtgctagga ttacaggtgt gagacactgc gccagccca tttgtaactt 41700  
 tattgttttc tcttacaggc aaatgtctg aaaaagactc tgcatgggaa tggcctgcct 41760  
 tacgatgaca gaaatggagg gaacatccac ctcttctata tatcagaatg gtgatatttc 41820  
 tggaaatgcc aattctatga agcaaataga tccagttctt cagggtgatc tttaccattc 41880  
 ccttgggaaa tctgaggcag attatctgac ctttccatct ggggagtatg ttgcagaaga 41940  
 aatctgtatt gctgcttcta aagcttgtgg taagtattaa aaaacagcat tttccttttt 42000  
 atgcatggat tgttttaatt atgctatgct aatactaggt acatgcataa tatatatttt 42060  
 tattttttta atgcttgtat ggctggcgtg tgtgttttca catgcataga aaatgaaagt 42120  
 gttactggag tacaatttat ggtgaatctg ccttgggcta ggtatcaaaa caaattgatg 42180  
 ccataaatg tttgctgact attctttata attacatata aggtgggtta aaaatcctgt 42240  
 catgggctat ctcatgacat aaggtaatat taaagctaga tcctgagagc aacatgaaag 42300  
 caaaaaatta atgttttgaa atatgtattt gatttaaaat cttgattaaa tggctgacaa 42360  
 accatcattt tcttctagtt agcttctgaa gacctctgcc aatctttcct catatatatt 42420  
 tcttatgtct ttgggtgata ttgaaatcat ttttactctt gagacctgat tatattatct 42480  
 atggacccaaa actgtgaacc agagaactct ttctatagag ctaacacatt ttactagacc 42540

ES 2 535 178 T3

actgaggtta ctatagagcc tactatcatg gtatctcatt tttaaatggt cttttaatag 42600  
 aaagactagt tgacactatt ttgaagaata gtcgtatgat tttatttgta gaggcaaatt 42660  
 aatgtctaa tatagtattt ataagaatgt atgattacat caatttattc tcttatttaa 42720  
 gatcagtata ggtcagaata accattaact gtaagttgga ggaagctagg tacatttcaa 42780  
 gttccttcta gctattttga aaaatacaat acattgttgt taactatagt caccctactc 42840  
 ttctatcaaa catttgaact tgttccttct gtctgtattt ttgtgcccat taaccaacat 42900  
 ctcttcattt ccctcttccc acccatataa ccttgccagt ctctgctacc aatccactct 42960  
 accttcagt gatcaacttt ttagctccca catatgaatg agaacttggt atatttgtct 43020  
 ttcagttcct ggcttatttc actcgacata atgacctca gttccatcca tgttgctgtg 43080  
 aatgacatga ttacattctt tttttagatg ccaactggcc ccaggggagt acgcattctg 43140  
 ttgtgagctg ggcttcaaaa tatcaccttg ctgtagctgc ttaggactcg gggggagcgt 43200  
 gggaccaggt gtgaacttcc tcaactggaat aggaaatgct tttgtgctgt ctctgggcag 43260  
 ccctctatgt gaatTTTTTg tcctgcaagg ggctagggtc tctcctgtga ctaaaattcc 43320  
 aggggttcac agtaggaatg tggaccattg ggcactctca acttaacctt tccctgtgtg 43380  
 gagtctctcc tagcttcttg ccaatcccgg ctgggcaggc tgtcttgttt cgtctccttc 43440  
 cttgcttttc tgttgaatac cagtgttctc cttggataat ctactcaaag tgtgattata 43500  
 tactcatggt tttagttttt agtggggaag tggatatgag agacctctgg tcagttatct 43560  
 tgactatatt gtaaagtctg tattttttgt tgtgtgtagt ctctgaaatc tctgatcctt 43620  
 tagcttatag taagatttta gcttgtaaga ttttttttagc ttttaagatt ttttagcttg 43680  
 taagatattt tttagctagt aagattttag cttgtaagat ttttagcttg ggccgggcac 43740  
 ggtggcttac acctgtaatc ccagcacttt gggaggctga ggcaggcaga tcacaagatc 43800  
 aggagatcga gatcatcctg gctaatatgg tgaacctca tctctgctaa aaatacaaaa 43860  
 aattagccag gtgtggtggt gggcacctgt agtcccagct acttgggagg ctgaggtggg 43920  
 agaatggcat gaaccagga ggcgggagctt gcagtgagcc gagattgccc cactgcactc 43980  
 cagcctgggc gacagagcga gactccatct caaaaaaaaa tttttttttg gcttgaaga 44040  
 ttcattttta gcatgtaaga ttttgcttta gcttgaaga tttttttttg acagatttta 44100  
 ttgaattcct agggccaaa gaaaataata gaaaagaaca aaaaactctt tcagtctttg 44160  
 cagattggct ctgtgttggg gctctcatte agtgtttacc cagtccattt acaactctgc 44220  
 cttagccttc ccttctctgt tgtgctgact ctaaagaaca gcttgaggtg aaagcttagg 44280  
 gtcttttctt ctaagttctg tccttgggc atgcatatgg cttttctact ctccaataca 44340  
 tagaaatgct tttcagtgt gtcatttccc aaataaactc tcctctgtca tctctgtttt 44400  
 ggttttcagt gtgtttattg tttgcctcaa ctttagacct ctgccccaga tagcaacagc 44460  
 ttgttcattt gcaatgtttt caatgaatat cttctgtgaa getgcttttc tgccctgaga 44520

ES 2 535 178 T3

aagtcctgaa ttaagtggaa cataggtgtg ctctttgcat cttttcttca gtcagtcccc 44580  
agtcagggca aaagagagaa aaacagtttt ttgagattaa ggttggctct gttcactcca 44640  
gagccagggga ccagagtttc acaactgggag caccaattgc catcttcaag actttgctta 44700  
actagggggga gtggagccgg ggctgggtggg caggacatgg gcgtagtggg tggtaaggg 44760  
aaagtaaaaa tgctgcacaa ctttctgccc atttttaagt ggctgttttc ttgattcagc 44820  
atztatctga ttgctgcata tctttgccta ttttctgtag tttatatgaa gttcattctg 44880  
acagttttta ctcatTTTT ttttctggtt tctgggagaa ggataggtcc ttggaactac 44940  
ctactccacc attttactg atgttactct tttacttttc taatcatgga agtaaagttt 45000  
aagatttttc tatctatatt ggtgagatta cccttggat cgtagtcaaa ctaaattcac 45060  
aaaatgtgtc aatttctctg ttcgctcttg gtctattctc tgtgatagta tacttaagat 45120  
ggaattgtct ttcattgttg gttgaactca aatataaatc ttgtctgggc ctgatgggtg 45180  
ttttttcttt cttcattggt attttgttat tcttcttctc tcccttcttc tgtctctttc 45240  
ttgctccttc tttcttttct tcttcttttg tttaaagtga tagagtttgt ttcctttttt 45300  
tttttttgag actgagtctt gctctgttgc ccaggctgga gtgcagcagc atgattatgg 45360  
cacactgcc a cctccgctt ccaagttcaa gtgattcatt tccctcagcc tctgactag 45420  
ctggactaca ggcaccacc accacacca gctaattttt gtatttttgg tagagacggg 45480  
gtttgccatg ttggccaagc ttatctcaaa ctctgactt cagggtatcc acctgcctcg 45540  
gcctctcaaa gtgtgtgagc cactgcacc agccagaatc tatttcttta atggttatag 45600  
ttctgtttaa gttttaaatt aatgaatctt tttaaagtta cttttcaca aaaattgtcc 45660  
atctgtctat attttcaagt ttattggcat aatggtgttc tagcactctt tgtcttcata 45720  
acttataaatt atgcttttta aaagttctta gtgtttatct gtgcctcttt ttttcttatt 45780  
atccttgaca aagatctatt ttgcaaagaa tcatctttta ttttgttact tctccctatt 45840  
ggatttttat catgtccatc tctaacctt ctttgggatt actctattgt ctctactat 45900  
attgagttag atacttagat catttgctct tattttctaa tataagcaga taaagctaca 45960  
attttctctc ttgagtttca ccttagttgt attccacaat ttttagtaca tgatattggg 46020  
aatcattatt cattataaat gcctcccaat gtatttttcc tttgacttct gagttatttg 46080  
gaagttattt gtaaataaaa gaatgaatgc aagtatactg tttaaaagt gctgctaaat 46140  
aatgttatta taaataactt accgaaatta ttacacatct gtaagtagac ggtcgtgtta 46200  
ataatttaaa ttaagaattt aagtcttctc tgtcagtttg tcatttgtgc cgtttctatc 46260  
tacagtgga aatagtgaac acataactag aataaaatac ttttgtgttc tgtgagcctt 46320  
atgttttaaa tatatagat taaaaaatt ttacatattc atttctgatt taattgaagt 46380  
gtggttagag aacatggtat gaatggttat tctgtggaac ttctaaagac ttgttttgag 46440

ES 2 535 178 T3

ttcacgtgat tgttgtgttt gtgcttgtgt gtgtacgtgt atgcgtatgt gtgaatgttc 46500  
 tataatatgct tgaaaatagc ttgtattatt tacttgtgtg gtttaggtat tctcttggtt 46560  
 ttttagttca gtggctttca accatttgtt gatgtacctt ctaaaatatac ttttaagaaa 46620  
 ttacatatgc actcacattt taagttgata tttaaaattt ttcattgtaa attaaaatag 46680  
 cccaaaggac ataattatta atgtattgtg taaaacttga cacattgttc ttttaagagt 46740  
 attcatgact tctaaatatt tttgtgattt gatacctatt aattaaaca actccttctg 46800  
 tgcaaccaca tgcaagcatg gatttttatt atacctcag ttcagggaaa cttgaaaatt 46860  
 tgaaccaacc tttctataga ggacaactga agaaaccaga tgaaatgttt taaaaatatac 46920  
 tgcttgaaaag agtctcagca gttatatattt aaaatactga cacacctgg agatattgtg 46980  
 ggtttgggtc cagactatcg cagtgaagca aatattgcaa taaagcaaat cacatgaagt 47040  
 tttaggttcc ccagtgcata taaaagttat gtttaaatta ttctgtagtc tgtaagtat 47100  
 gcaataatat tatgtccaaa aaagtacata ccttaattta aaaatacttt attgtcaaaa 47160  
 agcactcata atcatctgag ccttcagtga gtcataatct ttttgtagt ggagagtctt 47220  
 gccttgatgt tgatggctac tgactgacca ggggtgtggc tgctgaaggt tgggtggcta 47280  
 tggcaatatac ttaaaataag acaatgaagg ttgctgcatc agtggactct tcctttcgtg 47340  
 aaagatgtct ctgtagtatg caatgctatt tgatagcatt ttacctcag tagaacttct 47400  
 ttgaaaatag gaagttgatt cactcaaacc ctgccactgc tttgattaag ttgatgtagt 47460  
 attataaatc ctttgttgc atttcaacaa tattcacagc atcttcacca ggaatagatt 47520  
 ccactcctcaag aaaccacttt ctttgctcat ccataaaaag caattcctta tatgtccaag 47580  
 ttttatcgtg agattacagc aattcagcoa cgtcttcaag ctccacttct aattttagtt 47640  
 ctcttgttac ttctaccaca tetgcagtga cttccttcaac tgaagattaa atccctcaaa 47700  
 gatacccatg agagccagaa tcagcttctt ccaaactcct gttaatgttg acattttgac 47760  
 ctctctcat gaactacaaa tgtttttcat gacgtctaga atgggtaact ctttccataa 47820  
 gtttttttat ttactttgct tagatctgtg agaggaaaca ctgtgacagc cataacctta 47880  
 ctaaatgtgt ttcccaata ataagattg aaagtcaaat tgctccttat ccatgggctg 47940  
 cagaatggat gttgtgtag caggcatgaa aacaacatga aattcaatgt acatcttcat 48000  
 cagagctctt gggtgaccag gtgcattgtc aatgagtaat aatacttggg caggaatctt 48060  
 tttttctgag ctttaggtct caacgggtggc ttaaaatatt cagtaaacca cgctatatac 48120  
 agatgtgcta tcttctaggc tttgtgtcc catttataga gcacaggcag ggtaattgag 48180  
 catagttctt aatggccata gattttcaga atgggtcaata agcattggct tcaactaaaa 48240  
 gtcacttgtt gcattagctc ctcagaagag agtcattcag ttctttgaaa ctttgaaggc 48300  
 aagcactgac ttctttctag ctatgaaact actcctagat ggtatcttct tccaatagaa 48360  
 ggctgtttg tetacactga aaatctattg tttatcagtg atctttgtta gatctttgga 48420

ES 2 535 178 T3

taacttgctg catcctctcc atcaacactt getgcttcac cttgcacttt tatgttaggg 48480  
 acatggtttc ttttcttaaa cctcatgaac cagcctctac tagcttcttg cttttcttct 48540  
 gcagcttctc cacctctctc agccttcaca ggtttgaaga caattagggc cttgctctgg 48600  
 ttttagggtt ggcttgaggg aatattgtgg ctggtttgat cttctateta gaccactcaa 48660  
 acttttgtca catcatcaat aaggctgttt tgctctctta tcatttatgt atttactgca 48720  
 gtcgcatttt taatttcatt caaaaacttt ttctttgcat tcagaacttg attgactgg 48780  
 gcagagggcc tggtcttttag cctctcttgg cttttaataa taccttctc acttagttta 48840  
 attatttcta gcttttgatt taaagtgaga gatatgaaac tctttaatat atgaaactct 48900  
 tcctttccct tgaatgccta gaggccattg taggattatt aattggccta atttccatat 48960  
 tgttgtgtct cagggaatag agaggcctaa ggagaggag agacacagga atggctgtt 49020  
 ctggagcggc cagaacacac acagcatttg ttgcttatgt ttgtcatctt atatgggcac 49080  
 ggttcatagc ggcccaaat gattacaatt gtaatgtcaa agatcactga tcacagatca 49140  
 tcataactga tataataata aaaaagtgg aagtattgca agaattacca aaatgtgaca 49200  
 tagggacaca aagtgagcac gtgctgttgg aaaaatggg ctgacagact tactagattc 49260  
 acacttgctc taaatcctta ttttgtaaag aaaaaaacc cacaatatct gcaaagtaca 49320  
 ataatgcagg gtgcactaaa atgaagtatg tttgtataaa aaaagattgt gattaataat 49380  
 tcagttgtag gggttggtat atcaaaagat ttcgactgct attacatttt gttccgattt 49440  
 taagagttgt tactttagct tcatttcaa ttatagggtc tatgtaaaaa tattctgtt 49500  
 tgtaccttta ataattcctt tctctgctc ttttctaggt atcacacctg tgtatcataa 49560  
 tatgtttgct ttaatgagtg aaacagaaag gatctgggat ccaccaacc atgtcttcca 49620  
 tatagatgag tcaaccaggc ataatgtact ctacagaata aggtacttct ttcagtaaag 49680  
 taactcactt aatgctaaaa ggcaaatgg gagaaattat caaatatttt ttaattgcaa 49740  
 ggtacttaat accagatacc tgaaccaatt agttagcact catttaagat ttcatttaag 49800  
 attctattct gtttctccat cagagaaact gtttatacat gttgtgtaag tagaatactc 49860  
 tgagaataaa gctgttttgg tgggatgcca cttaactcct tatgattata attaaataag 49920  
 taaacaaaat cacagtggcc tttattaaca aaatcctaaa tgtttgggat attgctggtt 49980  
 tgtgcagcgt tttgtgcaat agaatgcaat ttcacatctt atctttataa agaacttttt 50040  
 aaaaagtga cgtgaagaaa agagactttt cccagtgtgt atttgcagcc tcaaattgta 50100  
 agttaattta tataatttat ggtaatgtgt aatgcctatt tagagaaatc tagaagtatt 50160  
 tttttgctcg aaaggatgaa acaaagatac gtttgatttg tgtctcaca atacctgtga 50220  
 ttttctaag catttatata catatatata taattcatca taacttcatg aggtgtaag 50280  
 atttccacat taaagataaa gaatttgag cactgagaag taatattact caaatttatt 50340

ES 2 535 178 T3

catggtcaca caggtaggaa ttgggagtca ggttcaaate caagcctggt ttgcttcata 50400  
 agcttgccctc ttaatcacct catgtgtact tcattaaaga gataatgtat atataatatt 50460  
 tattattgtg cctatcactt ggtgctctct caataaatth tagtattggt ttgcttcttt 50520  
 ctcttcccct attctatata aaaatatgca gttggatgtg tttgcattha ctgatgtcta 50580  
 atgtataatt tgcactgagt tcaaaaaaat atthttttata taattattga aaagacaatt 50640  
 ggtgaaaaaa ataatgttc aaagaaataa tagatgtaca aaaatcaaca gcattcttat 50700  
 atgcaagcaa ccagttatat aatagataaa gaagatccta tgcagtgtag ctacaaaaac 50760  
 ccttaactaa ccaggaatgg tcttaataag aaaaaacaga agacagtata ggaaaattag 50820  
 aaagttattt gaagaatatg aagaattagg acataacatt ggaatgggga gatggaatat 50880  
 tacaagatc aatttctctt atgctatate cttagctcta agccaatcaa aatcctaaca 50940  
 aaggcatttt acggaatttg acacattact atgtaaattg agaattatta aataagatag 51000  
 ccatgagaaa gaagacttac ctggcaattg taaaatattt tgtcccagga gatattttca 51060  
 cattatatga aactacaaaa tggatctctat tattaaagcc acataattaa attcagaatc 51120  
 ataaactaaa taatgagaat gatggggcca gtatatcttg aaagtactcc ttcatacata 51180  
 tagaaacata ataatatgaa gaaatctttt catattaacg tggaggggag agattagtca 51240  
 acaaatggtg gtagaatagt tgattagctg tttgaataaa atthtttagctt cttactttat 51300  
 aatgtatatc agataaatta tagattgatt aaagatcaga ttgatatgta aatagaaatg 51360  
 taaagaaaat caaactataa aagtctgaat tggaaactgaa ttcaagtccct tgggaaaata 51420  
 ccatttaagt tgcaaaaaca tagaaaaaat catatgggaa tgactgcaat tgtcaactat 51480  
 aaaaattttc aaatgtctga aggtttcctc ttaaaatgaa aaggcaggag ggtggagcca 51540  
 agatgactga ataggaacag gtccagtcta cagctcccag catgggcat gcagaagacg 51600  
 ggtgatttct gcatttccaa ctgaggtgta ccgggttctg ctactgggg agtgtaggaa 51660  
 agtgagtgta ggacagtggg tgcagcacac tgagcatgag ccgaagcagg gcgagggcatc 51720  
 gccacaccg ggaagcgcaa agggtcaggg aattcccttt cctagtcaa gaaaggggtg 51780  
 acagacggca cctggaaaat cgggtcactc ccactctaat actgcgctat tctaacggtat 51840  
 ttagcaaatg gcacatatcc cgcgcctggc tcagagggtc ctacgcccac ggagcctcgc 51900  
 tcattgctag cacagcagtc tgagatcaaa ctgcaaggtg gcagcgaggc tgggggaggg 51960  
 gcgcccgcca ttgccgaggg ttgagtaggt aaacaaagca gccaggaagc tcaaaactggg 52020  
 tggagcccac cacagctcaa ggaggcctgc cggcctctgt agactccacc tctgggggca 52080  
 gggcatagcc aaacaaaagg cagcagaatc ctttgagac ttaaatgtcc ctgtctgaca 52140  
 gctttgaaga gtagtggttc tcccagaatg cagctggaga tctgagaacg gacagactgc 52200  
 ctcatcaagt gggtcctga accccagta gcctaactgg gaggcacccc caagtagggg 52260  
 gagactgaca cctcacatgg ccgggtactc ctctgagaca aaacttccag aggaacagtc 52320

ES 2 535 178 T3

aggcagcaac atttgetgct caccaatata cgctgttctg cagccactgc tgetggtacc 52380  
 caggcaaaca gggctctggag tggacctcca gcaaactcca acagacctgc agcagaggggt 52440  
 cctgactgtc agaagaaaaa ctaacaaaaca gaaatgacat ccacaccaa accccatctg 52500  
 tatgtcacca tcatcaaaga caaaaggtag ataaaaccac aaagatgggg aaaaaacaga 52560  
 gcagaaaaac tggaaactct aaaaatgaga gcacctctcc tcctccaaag gaacgcagct 52620  
 ccttaccagc aacggaacaa agccggatgg agaattgactt tgacaagttg agagaagaag 52680  
 gcttcagacg atcaaaactac tccaagctaa agggaggaagt ttgaactcat ggcaagaag 52740  
 ttaaaaacct tgaaaaaaaa ttagacaaat ggctaactag aataaccaat gcagagaagt 52800  
 ccttaagga cctgatggag ctgaaaacca aggcacgaga actacgtgat gaatgcacaa 52860  
 gcctcagtag ccgattcaat caataggaag aaagggtatc agagatggaa gatgaaatga 52920  
 atgaaatgaa gtgagaagag aagtttagag aaaaaggaat aaaaggaaac aaacaaagcc 52980  
 ttcaagaaat atgggactat gtgaaaagac caaatctacg tctcattggt gtacctgatg 53040  
 gggagaatgg aaccaagttg gaaaacactc tgcaggatat tatccaggag aacttcctta 53100  
 atctagcgag gcaggcaaac attcaaatc aggaaataga gagaacgcca caaagatact 53160  
 ccttgagaag agcaactcca acacacataa ttgtcagatt caccaaagt gaaatgaagg 53220  
 aaaaaatggt aagggcagcc agagagaaag gttgggtaac ccacaaaggg aagcccatca 53280  
 gactaacagc agatctcttg gcagaaactc tacaagccag aagagagtgg gggccaatat 53340  
 tcaacattct taaagaaaag aatcttcaac ccagaatgtc atatccagcc aaactaagct 53400  
 tcatatgtga aggagaaata aaatccttta cagacaagca aatgctgaga gatcttctca 53460  
 ccaccaggcc tgccttaaaa gagctcctga aggaagcact aaacatagaa aggaacaact 53520  
 ggtaccagcc actgcaaaaa cagcccaaat tgtaagacc atcgaggcta ggaagaaact 53580  
 gcataacta atgagcaaaa taaccaggta acgtcataaa gaccggatca aattcaccca 53640  
 taacaatatt aaccttaaac gtaaatgggc taaatgctcc aattaaaaga cacagactgg 53700  
 taaactggat aaagagtcaa gaccatcag tgtgctgtat tcaggaaacc catctcacgt 53760  
 gcagagacac acataggctc aaaataaagg gatggaggaa catctaccaa gcaaacggaa 53820  
 aacaaaaaaaa ggcagggatt gcaatcctag tctcggataa aacagacttt aaaccaacaa 53880  
 agatcaaaag aaacaaagaa ggcattaca taatggtaaa gggatcaact caacaaaaag 53940  
 agctaactgt cctaaatata tatgcacca atacaggagc acccagattc ataaagcaag 54000  
 tccttagaga cctacaaaga gacttagact tccacacaa aataatggga gactttaaca 54060  
 cccactgtc aacattagac agatcaacaa gacagaaagt taacaaggat atccaggaat 54120  
 tgaattcagc tctggacca gcagacctaa tagacateta cagaactctc caccocaaat 54180  
 caacagaata tatatcttca gcaccacacc acacctatc caaaattgac cacatagttg 54240

ES 2 535 178 T3

gaagtaaagc actcctcagc aagtgtaaaa gaacagaaat tataacaac tgtctctcag 54300  
 accacagtgc aatcaaaacta gaactcagga ttaagaaact cactcaaac cactcaacta 54360  
 catggaaact gaacaacctg ctctgaatg actactgggt acataacgaa atgacggcag 54420  
 aaataaagat gttctttgaa accaacgaga acaaagacac aacataccag aatctctggg 54480  
 acacattcaa agcagtgtgt agagggaaat ttatagcact aaaggccac aagagaaagc 54540  
 aggaaagatc caattgacac ctaacatca caattaaag aactagaaa ccaagagcaa 54600  
 acacattcaa aagctagcag aaggcaagaa ataactgaga tcagagcaga actgaaggac 54660  
 atagagagac aaaaaaccct tcaaaaaaat caatgaatgc tggagctggg gttttgaaaa 54720  
 gatcaacaaa attgatagac tgctagcaag aataataaga aaagagagaa gaatcaata 54780  
 catgcaataa aaaaatgataa aggggatc aaccgatcc cacagaaata caaactacca 54840  
 tcagagaata ctataaacac ctctacatga ataaactaga aaatctagaa taaatggata 54900  
 aattcctgga cacatacacc ctcccaagac taaccagaa agaagttgaa tctctgcata 54960  
 gaccaataac aggctctgaa attgaggcaa taattaatag tttaccaacc aaaaaagtc 55020  
 caggaccaga tggattcaca gctgaattct accagagggtg caaagaggag ctggtaccat 55080  
 tccttctgaa actattcaa tcaatagaat aagagggaaat cctccctaac tcattttatg 55140  
 aggccagcat catcctgata ccaagcctg gcagagacac aaccaaaag gagaatttta 55200  
 taccaatc cttgatgaac attgatgcaa aaatcctcaa caaatactg gcaaaccgaa 55260  
 tccagcagca catcaaaaag cttatccacc atgatcaagt gggcttcag cctgggatgc 55320  
 aaggctggtt caacatcgc aaatcaataa acgtaatcca gcatataaac agaactaacg 55380  
 gcaaaaacca tatgattatc tcagaggcag aaaaggtctt tggcaaaatt caacaacctt 55440  
 tcatgctaaa aactctcaat aaattaggta ttgatggag gtgtctcaa ataataagag 55500  
 ctatctatga cataccgaca gccaatatca tactgaatgg acagaaactg gaagcattcc 55560  
 ctttgaaaac tggcacaaga cagggatgcc ctctctcacc actcctattc aacatagtgt 55620  
 tggaaagtct gccagggca gtcaggctgg agaaggaat aaaggttatt tgattaggaa 55680  
 aagaggaagt caaattgtcc ctgtttgcag atgacatgat tgtatatctg gaaaaccca 55740  
 tcgtctcagc ccaaatctc cttaaactga taagcaactt cagcaaagtc tcagcataca 55800  
 aaatcaatgt gcaaaaatca caagcgttct taccaccaa taacagacaa acagagagcc 55860  
 aaatcatgag tgaactcca ttcacaattg cttcaaagag aatacctagg aatccaactt 55920  
 acaagggatg tgaaggacct cttcaaggag aactacaac cactgctcaa tgaagtaaaa 55980  
 gaggatacaa acaaatggaa gaacattcca tgctcatggg taggaagaat caatattgtg 56040  
 aaaatggcca tactgcccaa agtcctttat ggattcaatg ccatcccat caagctacag 56100  
 atgactttct tcacagaatt ggaaaaaact actttaagt tcatatggaa ccaaaaaaga 56160  
 gccacattg ccaagtcaat ctaagccaa aagaacaaag ctggaggcat cacgctacct 56220

ES 2 535 178 T3

gacttcaaac tatactacaa ggctacagta accaaaacag catggtactg gtatcaaaac 56280  
agagatatag accaatggaa agaaataatg ctacctatct acaaccatct gatctttgac 56340  
aaacctgaca aaaacaagaa atggggaaag gattccctat ttaataaatg gtgctgggaa 56400  
aactggctag ccatgtgtag aaagctgaaa ctggatccct tccttacacc ttatacaaaa 56460  
attaattcaa gatggattaa agacttaaat gttagacctt aaaccataaa aaccctagaa 56520  
gaaaacctag gcaataccat tcaggacata agcatgggca aggacttcat gtctaaaaca 56580  
ccaaaagcaa tggcaacaaa agccagaatt gacaaatggg atctcattaa accaaagagc 56640  
ttctgcacag caaaagaaac taccatcaga gtgaacaggc aacctacaga atggggagaac 56700  
atthttgtaa tctactcatc tgataaaggg ctaatatcca gaatatacaa tgaactctaa 56760  
caaatttaca agaaaacaac aaccatcaaaa aaaagtgggc gaaggatagc aacagacact 56820  
tcttgaaga agacatttat gcagccaaaa gacatgaaaa aatgctcatc accactggcc 56880  
atcagagaaa tgcaaatcaa aaccacaaag agataccatc tcacaccagt tagaatggcg 56940  
atcattaaaa agtcaggaaa caacaggtgc tggagaggat gtggagaaat aggaacattt 57000  
ttactactgtt ggtgggactg taaactagtt caaccattgt ggaagtcatg gtggcgattc 57060  
ctcagggatc tagaactaga aataccattt gaccagcca tcccattact gggatatatac 57120  
ccaaaggatt ataaatcatg ctgctataaa gacacatgca cacgtatgtt tattgoggca 57180  
ctattcacia taacaaagac ttggaaccaa gctagatgtc caacaatgat agactggatt 57240  
aagaaaatgt ggcacatata caccatggaa tactgtgcag ccatgaaaaa tgatgagttc 57300  
atgtcctttg tagggacatg gatgaagctg gaaccatca ttctcagcaa actatcgcaa 57360  
ggacaaaaaa ccaaacactg catgtttctc ctcttaggtg ggaattgaac aatgagaaca 57420  
catggacaca ggaatggaac atcacatacc ggggcctggt ctgggggtggg gggatggagg 57480  
agggatagca ttaggaaata tacctaagt taaatgacga gttactgggt gcagcacacc 57540  
aacatggcac atgtatacat atgtaactaa cctgcatggt gtgcacatgt accctaaaac 57600  
ttaaagtata atagaaaaaa atgaaaaggc aaattgtaaa gatagtttca acaaatcaaa 57660  
taaacataag gttagtattc ttgtaagtat gaaatttaaa acagtgtatc catttaacaa 57720  
ttacttaatg tacatgaata tatagcgtca ctagttagga gaataatgaa cgagattgct 57780  
tgctttagca catagttaca actattcatt attcttataa ctagtgtatc tgagaatttt 57840  
ttgaaaaggc cattaatgat ttgttcttct tttgttaaat atttcttcat gtacattaaa 57900  
taattgttta atggatacag tgthtttaat gccacaacaa tagaggatca agatgaaatg 57960  
gacaaattcc tagaaaagaca caagttatag gaactgctaa aagaaagaac agaaagtttg 58020  
aataggtcta tgacaaataa agaaatcaaa ttagcaattt ttataaaagc ccaggcccaa 58080  
gtggcttcac ttgtgaattc taccacacat taaaaaaatt attactagtt attcacaacaa 58140

ES 2 535 178 T3

aatagaaaag gaaggaggat ttctgagctc tttctgtgag ttcagtatta ccctgataac 58200  
aaattcagac aaagatgtct agaagaaaag aaaactacag accaatgttg taggtagaaa 58260  
atcaacaaaa tacttgcaaa ccgaatccag caatacagct tgaatatgtc ttatctgaaa 58320  
tgcttgggac cagaagtgtt ttggatttta gatttttttt tttttttttg gatttttagaa 58380  
tatttgacaga gtatcagctg gttgaacata cctaataataa aaatctaaag tctgaaatgc 58440  
tctgatgaat atttcttttg cacatcaggt tagcgctcta aaggttttga attttgagc 58500  
atltcggatt tcagattttc aggttaggaa tgctcagttt gtttataaaa agatgaaata 58560  
ctatgaccag gtgggattta tcccaggaaa tacaaggcta gtgtaacttc caaaaatcaa 58620  
tcaatgtaat acaccacatt aatagaataa atgacccaaa ccacatgatc atcccaagag 58680  
acacagaaaa agtatttgat aaaatccagc atcccatcat tataaaaaaa ctcaacacaa 58740  
taggaatggc aaggaacttc ctcaatttgt taagggcat ctgtaaaaaa ttcaaaaagta 58800  
atgtcatact tattagttaa agactgaatg ccttttccct atgatcagga atgagatgag 58860  
gatagctact tttaccactt tgatttaaca ctatactgta gattcagggg agggaaatta 58920  
ggcaagaaaa agaataaaa ggcatttata ttggaaaata agaagtaaaa ttgtagtcat 58980  
cccgtgtat ccatgggttt cacatccatg gattaacca actgcagatt gaaaatactt 59040  
ggaaaaaaag ttgtgcttac actgaacatg tacagacttt ttcttgtcat tactccctaa 59100  
agaatacggg ataacaacta ttacataac atttacattg tattaggtat tataaatagt 59160  
ctagagattt taaagtatac tgaaggatgt gcacaggtta tatgcaaata ctatgccttt 59220  
gtatatcagg aacatgagta tttgcagatt ttggtatgtg tgggagggtc tggaaactagt 59280  
actgcataga taccaaagga tgattgtgta ttcacagatt acatgatcct gcatattaaa 59340  
aatcctaagg aattaataaa aaaactatta gaactaataa atgagctcag gtcagttgca 59400  
gaatagaaga tcaatataa aaaatcagtt gtatttctat acagagacaa agaacaatcc 59460  
aaaaatgaaa ttaaaaaaat ttcattaaca atagcataac aaatttttag gaataaactt 59520  
aaagaagtgt aaaatgtata cactgagaaa tataaaacat cattgaaaga aattaaggaa 59580  
acacctaaat aaatggaaag atatctcata gaggacttca tatttttaag atggcaatac 59640  
tccttaattg atctgtatgt tcaatgcaat tcctactgaa ttccctaaatg tctttattgc 59700  
agaaattgac aggttaatca taaatttata taaaagcaa agggacttag catagctaaa 59760  
acaatcttga aacaatacaa agtttgaaga cttatacttc ctaattacaa aatttattac 59820  
aaaaggactg taatcaagac aatgtgatac taaaggatga atatacagat taatggaaa 59880  
gaattgacag tctcaatata atttctcaca ttgatgggta ttgatttttg atcaggggtc 59940  
caagacaatt catgggcata gaatagtctt ttaaactaac agtgccgggga caactggata 60000  
tccacatgta aactaatgaa gtaagacaat ctacttcaca ctatatacaa aaaaaaaaag 60060  
cttaaagtgg atcataggcc tatatatgag agctaaactt attaaaactc caagaagaaa 60120

ES 2 535 178 T3

cacagaagtc tttgtgtact tagattaggc agtggtttct tagatatgac accaaaagct 60180  
caagtgacaa aagaaaaata gttaagttag gctttatcaa agttaaaaac atctgtgtgt 60240  
caaagcacac tatcaaaaat gcgaaaagac caccacaaa tgggttccac aaaatggaag 60300  
caaatgtttg ggaatcatat atctgataat tgtcttatct ccagaatata aaagaattct 60360  
tacagctcaa caagacaatg acaacttaat ttaaaaagta ggcaaggac ttggatagac 60420  
atTTTTccaa ataagatata caaatggcca aaaagcatgt aaaaagatgc ccaacaggtg 60480  
ggccccgag cgggcgtccg ggaccgtggt gtgccaggcg ccttccgccc ttaacatgcg 60540  
gtggctggcc caggcgggtc aggagctgga gcggggcccg agtggggcgc cagagcccca 60600  
gcgcgagcag gagaggggcc ggagcgcgga tccgcgccgc gctgctgaag cctggccggc 60660  
caccagacg ctgccggcag cctggccatg gcggagccaa ggaagaatc tctatacaa 60720  
caaatatgtg gctatcaaat tggagctgat caagttccgg accccgcagc tgcacctggg 60780  
taccggttct acaagcagct cagcgcata gagggcgtcc ctcaggteta ctacctacta 60840  
cagcctggag gacctgttcg accttcacgc ccaagacggt gctcctgac gccatccggc 60900  
tgatcacgcg catggattat gtgcacacca agaacctcat ttaccaggac gtgaagcccc 60960  
agaacttct ggtggggcgc ccggggacca agcggcagca cccatccac atcatcgacc 61020  
tcgggtggc caaggggtac actggtctca ggaccaagaa gcacatcccg tgcagccagc 61080  
acaagagctt gacaggtacg gcgtgctaca tgagcatcaa catgcacctg ggcaaggagc 61140  
agagccactg caacaacctg gaggtgctgg gccacatgtt catgtacttc ctgtgcagca 61200  
gcctccccg gcaggggctc aaggctgaca cgatcatgag cggtagacaa gatcggggac 61260  
acatagcgcg ccacgcccac cgaagtgtc tgcgagaact tcccagagga gatggctacg 61320  
tacctgcact acgtgcggcg cctggacttt gagaagcccg actgtgacta catcgggcgc 61380  
ctggactttg agaagctcga ctacgactac ctgcggaagc tctccageta cctcttcgac 61440  
cgaagcggct tcgtgttcga ctctgagtac gaggggctcg ggaagccctt ggcgaccccc 61500  
atcagcagtg tccacaccga cctgccctcc cagcctcagc ttccgggaaa agatcagccg 61560  
cacagcaaaa accaggcgct gaactccacc aatggggagc tgaacgcgga cgaccccatg 61620  
gccggccact ccagcgcaca tcagggcgcc tgcagagatg gaggtggcg atgaaacgaa 61680  
atgctgctgt ttcttcccc tgaatcttct ccgtgcggcc ccttggggag cgagcttgtg 61740  
tgagggcctt ggggcccacc cacagcggcc cagggccaga cgtggctgg aagccaggac 61800  
acagactgca gggctctggc cggcggcccc atccccgga cgaggggtca cttccttcac 61860  
gtaagactgg ccaaaatttc ttttttttt ttttttttt ttttgagacg gagtctcgt 61920  
ttgtcgccca ggccggactg cggactgcag tggcgcaatc tcggctcact gcaagctccg 61980  
cctccccggg tcccgcatt ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga ctacaggcgc 62040

ES 2 535 178 T3

ccgccaccgc gcccggttaa tttttgtat ttttagtaga gacggggttt caccttgta 62100  
 gccaggatgg tctcgatctc ctgacctcat gatccaccocg cctcggcctc ccaaagtgt 62160  
 gggattacag gcgtgagcca ccgcgcccgg ccaagactgg ccaaaatttc tacacctgtg 62220  
 tctagtcctc ccctccaaga gcattaacta tttaaaacaa ggaataaagg aaaaaaaga 62280  
 aaggccccct ccacccccac ccctccatta ctttgctgaa gtgagtagtg ggatcctgga 62340  
 ggcccccagg gctgaggccc agccagctgc ccccgttagc gtcataaagt ccagcttgtc 62400  
 tcctcatcc aaaggccgtt ttctcagtgg gagggcaggc ctggcctgga ggggtgctgt 62460  
 ggggccatct tgcccaggcc cacctgggag ggacacaggc attgctgcca ggggtgaggc 62520  
 tgtgccccag gcctcccaa aactaaaggg gaacggaggg gtggggccgc ggctgaagcc 62580  
 agccccgcaa ccaaatgct gcaccaaagc tcggtcgcca caggcacggc caccgcagcc 62640  
 tttcacagcc tggccccggc gaggggcagg tgggccctgc taggagggtg cttctcgagg 62700  
 cacctgttcc ccgaggctgt gctccgacct tcagaagctg aggggggtgg gccggctggc 62760  
 gtcgcgcccgc tcggcccctg ggcccctgctg tgtggaggcg cgcgggctcg tggttctctg 62820  
 tctctgtgct ccgccccctg gcaagcagcc gcagacaaaa tgccctaaag cccccgacct 62880  
 agccccgcag gtgtatgtgc aggggggtct gcgggcggcc ctggactggc tggcggactc 62940  
 ccagcgggtc agcttgaggc agtgcccagg gcggtggccg tgagtctggt ttttgcttta 63000  
 ccaagtgtac ggaatggcg tttacgtttc tctgatgctc ttttgaagcc atacaactta 63060  
 ggggctttta aaaaaaaaaag gaaaaatgaa accctccgaa aaaaagatgc ccaacatcat 63120  
 tggtcattag agaaatacaa atcaaaacca cgatgggata ataataggtc tacaaggatg 63180  
 gcaaaaatca gaaagacaaa caataacaag tgtagagaa tttggactaa tttggatgca 63240  
 gtatatgtct gttgggaatg taaagtggtg ctgctacttt ggaaaacagt ttggccattc 63300  
 cttaaaaggg taaacaaaga gttaccatat gactcagcaa ttctacttct agatatatat 63360  
 gcaatagaaa tgaaaacata tccacaaaaa cttgtacatg actcttcata ctagcgttat 63420  
 tcacaataga aaaataatag aaacaaaccc aaatgtctgt caggcgatga atggatacag 63480  
 aaaaagtggc atattcatac aatgaaatat taatttggca ataaaaggaa atgaagtaat 63540  
 gatacatgct ctaatgtgga tgaacctga aaacattatg ctgagtgaaa gaaggcagac 63600  
 agaaaggcca catgttctaa aattagattg tgatatttgt acaatgctat gaataaacta 63660  
 aaaacattga attttacct ttaagtgggt ggactttatg gtatgtgaat tatactcaa 63720  
 taaagggtgt actaaaagac aatatagagt gttctttggt tctctgaagg acaagttttt 63780  
 aacttcatt tctccaaata agcaattatt tgtttttata ccaaattagc attttcagat 63840  
 tcctactga tgttactgga ttaagctatg tttttaactt tttgttaatt tctacathtt 63900  
 ttgtttccta ctattgcttc tacathttgt gcaactgaagg aggtagtata ttgathttac 63960  
 acttacatht cttgtacttt ctgcctatat tagtgttatc cacatatcct tttgtctcac 64020

ES 2 535 178 T3

atttatattt aatactgtta gctgtgtttt ctaagtatgg gataatacct ttcagtatgc 64080  
 tgtagggtgac tatatataga tagtacgttt gtatttgaac tatttggaag ctgaccaaatt 64140  
 gtttttatta tctttagat tttactttcc tcgttggtat tgcagtgcca gcaacagagc 64200  
 ctatcggcat ggaatatctc gaggtgctga agctcctctt cttgatgact ttgtcatgtc 64260  
 ttacctcttt gctcaggtat gattatatta tcttacttgt acatgagtta aatgataaat 64320  
 atcttgctgt ttaataagtc acttaatcag gaaaaacttt acatatggga aaattgcagt 64380  
 tctgtcttgc acagcaggtg cagagaagta acaaaattga gtcttttagc actagttttt 64440  
 aatcccatgg tttatggata atagaatcta ttttataaag tttttttgga ctgatccttt 64500  
 tgaatttctt tcttttttag gacttttagat cattttaagg atttcgcaa gtatagactg 64560  
 aggtttacaa catgattcat gtagacatac gtggctaaaa tattagtaac atttctttat 64620  
 ggtttttaaa aaaatttttg gacaatttca ggcttacaca atggacaatg aactgtagag 64680  
 aaagtaggtt acataaaaa atgagctctg atagtttgtt tagctgttta taggaaggtg 64740  
 actggatggt gatacttagt ctaagagcta tattcaagtt atttgttcac taatacagtt 64800  
 atgtcaaatt tttgtattgt gttggatatt cataatgctt tcttctctat taccttgatt 64860  
 taaacagtaa ttgaaatatt ttgtcattaa ataacttgtt tttatgtgct gctagactag 64920  
 taggaataga aattaaagga agaaaatata ttagtgctct tgggtaaaaa taggcacttg 64980  
 gtatcccaa ggtatcagga gttctaaatc agatttgcta atattgtagg aaacaagccc 65040  
 acagatcctc atggctcgca tttctgagag gaagcctagt aagcctagtt cagtttatga 65100  
 acaacaaaag gaaaaacatt tctctattgg ggtatgagac caacaaactt tatttttatt 65160  
 gtggtaagag atataataa aaaatgacca ttttaacat ttttaagtga cagttcagtt 65220  
 gtattaagta caaatacatt gctgtacaac catcaccacc atccatctcc agaacatttt 65280  
 tcatcttccc aaatggaac ttcataccca ttaaataata actctgtatt tcccactccc 65340  
 aatggccttt tgcaatcacc attctacttt ctgaatataa atctgccttt tctatgtacc 65400  
 tcatacaaat ggagttatat agcatttgtc cttttttgac tggcttattt cacttagcat 65460  
 aatgtctgtc aggttcatcc atgttgtagc atgtgccaga atttctttcc tttttaagge 65520  
 tgaataatat tccattgcat atgtatactg cattttattt gttcattcat ctgttgatgg 65580  
 atacttgggt tgctgctgtg aacatgggta acaaatatt tccttgagtc cctgttttca 65640  
 gttcttttca atataatccc agaaatggaa tcgctggatc atatggtaaa tttataattt 65700  
 tttttgagga actgctacat tgttttctgt agtggctgca ctatttttca gtcctaccag 65760  
 cagtgcacaa gtgttccaat ttctcaacat cctcaacaat gctttgcttt gtttgataat 65820  
 agccatctct atgggtttga ggtggatca ttgtgatttt gatgcatact tctctaacaa 65880  
 ccagtgatca tgagcatctt ttcatatgct tgttggccat ctgtttatct tctttgcaga 65940

ES 2 535 178 T3

gatgttgctt gttggctatt tgtttatctt ctttgcagag atgtctactg aagtcctttg 66000  
cccatTTTTa aatcagggtg tttgtttggt gttatattat agaaattatt attctggatc 66060  
ttaactcctt ataagataca tgattttag atagtTTTTc ccattctcta ggttgccttt 66120  
tcattctggt gcttgtcttt tgatggacaa aagTTTTaaa tttggctgta ttctaattta 66180  
tctatTTTTt gttcctatg ttttgggtgt catatccaag aatcattgc caaatccaat 66240  
gttatgaacc tttctttctg ttttcttgta agagtTTTTat catttttagct cttacattta 66300  
ggcattgggt ccattttgag ttaatttttg tctatcgtga aggtaagggc ccaacttctt 66360  
ttgcttgtga atatccagt ttcctagcac catttgttga aagactgtct tttctccatt 66420  
gaatggctctt ggcacctttg ttgaaaatca tttgaccacc aacctacttt tttatacagc 66480  
tcctttatct gtatagccat tatgaaaaga gaggggaatg gagagaggct tctaagaata 66540  
gccttttgaa aacaggatat tatgaggta caactttctg ttgcttttac gggatatatta 66600  
tttcacctgt gctgcagagc tagtatattt tggggtagg ctagttaagt cccatttata 66660  
agccaagttt tcccaacta ttcattcagc tacttttagcc taatattaat actgcaatgt 66720  
ctagtatttt tgatctagaa aaattttggg tgatttcaga atactcaatt ttatccttct 66780  
aggaaggatt gtcttatcta gcatggcaag gtaattccac catataattc taaattatgt 66840  
ctagatagta ccacaagcaa ttttctattt ttaatgttt ttacttctct aaatttgtgc 66900  
ccagaaaata tgatagtatt tagattactc taagattgta ctgttatcat tttatattat 66960  
atgcatgttg tagactatat atagcaaatg tgaccagtgg cattaccaga gtgtaagaat 67020  
atcttgacat ctttaaataa ccaaaaaata gataagccac tgaactgtct ttaaagtctt 67080  
taagacagta cctgtaggaa gacagatttg gaaaaggtaa gcaataaaa atcaaaagta 67140  
agatggccct tttaaattca gtttctctg ggaattaatt gcctttatat catcaaatat 67200  
ggctgctaag caaataaact gctgacatgt gaacaacttt taattaattc atatctattc 67260  
aacaacaatt ggatgtttac ctcatgttct tggcatcatt tctgattttg tgactgtgac 67320  
tgttttttat ttccctggct aatgaagatg taaatttctt aagttcaaat tttgtcagct 67380  
actcaaatga gaaaaggttt tctttcttat tttatTTTTt tatagagatt gaactcctgg 67440  
gctccagtga ttgtcttgct tcagcctgtc agcctcctga gtagctaggt acagggtgtgt 67500  
gccactatgc ctggctaatt tttttagttt tggttttgtg gagatgggggt ctcgctctat 67560  
tgtccaggct ggtttcaaac acctggcttc aatgatcct cctacctcag cctcccaaag 67620  
tgctgggagt acgagtgtga gccaccacac ctggcctgaa atttttcagt agttctaatt 67680  
aaatgaaatt tctgagggtg catactataa tatttaagga atagtattta ttatgttttg 67740  
gcatttgaga ctctccatt tgtaactttt ctctagttaa tagtttatta tgtttttagt 67800  
attgccatca ctcatTTTTc atatatttat tgtcttctga tcatgacttc catagaattt 67860  
ccacatgagc agaatttgtt atctaccagt tcttttcttt tcttttcttt tttttgagat 67920

ES 2 535 178 T3

ggagtctccc actggtgcct gggctggagt gcaatggcgt gatctcgget cactgcaacc 67980  
 tctgcctccc aggttcaagt gattctcctg actcagcctc cctagtaget gggattacag 68040  
 gtgcctgccca ctacgcccggt ctaatttttt gtatttttag tagagatggg gtttcaactat 68100  
 gttggccagg ctgggtctcga actcctgacc ttgtcatctg cctgccttgg ccttctaaag 68160  
 tgctgggatt acaggtgtga gccactgcac ccagcccatc tactagttct ataggggaacc 68220  
 aaggcaggct attaaaaaga atctaccaag tcattgatca tcttctactt aaacagtata 68280  
 acttacttgc ctgttctcaa aagtgtgggt aaataagtgt ttaaaattga gcaaaaatct 68340  
 gtctcctacc ctgaattaat tttgtattag caacgttttag gcctttgttt tgggtgatac 68400  
 tgattatttg atgggtgtgtt tcttaatagt ttattttctt atatgaaaat atcttctata 68460  
 ttttattaat agaaaagcaa atatactttt aaatatgttt cttttaataa aattagttta 68520  
 aaaaggttcc agtaaagcct taatttcatg agacaagtta ttacatcaag agaagagaaa 68580  
 tacagatgta gagtatagag ggcccttgtc cggtttaaaa ccttgattcg cattgttatt 68640  
 ttaggtaata tggctcttac ctttttttct acaaagaaaa ttggtattat gtttagaata 68700  
 tttgtacttc tgctttcttt ttctttctcc cattacatgt tcagtcagat ttatctgat 68760  
 tcctaaatcc tccaggtcaa aatcgtagaa cctctgtgtt tctctcttct tcattcttta 68820  
 gacaatatat agttaataaa gttatcagcc ttttttcaga atcttttagt atcttctgtt 68880  
 tcctggatca gatccttatt atttctatc tgagccatac accagcctct taaagagcct 68940  
 ccgtaaatac actttatfff cttcaagcac ttctatcatt gctactactc tgccaatgga 69000  
 agagacatga tgaaaacaga tctccatagt ttctaggatc aggtcattca agggtaacctg 69060  
 cagtcggacc ccaacttact tttctaagtt ttaatccaca ttatttcttc acataaactt 69120  
 caggccctaa tcaaattagt ttatgcatct gaacatatct ggtgcttttg tgtgtgtgtc 69180  
 attccttcta tttctttacc ctgttttgtg tccatcatac atttctttat ttttaaacac 69240  
 actgtgaagt ttcaaatctt ccatgaaacc ctcttgatt actccagctg aatataatct 69300  
 taactttctc caagttcctg aaggagcttt tgtgtgggtgc ttctatatac atgtctgggtg 69360  
 ttataattat ttgcttctgt ttgcttctc agctaaatft tggtoctctt gatgactgag 69420  
 accacatctt atacagtcac gtgtcactta cttatgggga tatattctga gaaatatgtc 69480  
 gttaggcaat tttattgttc tgtgaatatac atgtattgta cttatacaaa cctatatgtt 69540  
 atagcctagt atatgcctag tctgtatggg atagcctatt attgctctag gctacaaact 69600  
 tatatagcat gttgctgtac tgaatattgt aggcacttgt aacacaacgg taagtatttg 69660  
 tgtagttaa catatctaaa cataaaaaag atacagtaaa aatgcagtat tacaatctta 69720  
 tggaaacctc gttatatatg tggctctgcc ttgaccaaaa cattgttatg gggcacatgg 69780  
 ctatttcttt gtatccaaca ccactttagt tatgatactt ccaacataat tggagttcag 69840

ES 2 535 178 T3

tatatattta actcagtaat atctacttta atttaggtaa tttttatgta gaagatataa 69900  
 tttgaagata tatttaaatga aataggttga tgttatatgt actctgtaat tgggaaccca 69960  
 gtgtaaatca gtttccattt gcaaatgaac ttttattaaa attgtatcgc aaaatgaatg 70020  
 aaaattaaag gaggaattta tgccatttat ttatttatta atcatttttag agactgggctc 70080  
 ttggtctggt acccagacta ggggtgcagt gtgtgatcat agctgaagag atcctcctac 70140  
 ctcagcccc caagtagctg ggactgcagg tatgtgccac catgcctgga taatttttaa 70200  
 attttttggt gagatgagat ctgccatgt tgcccaggct ggtctcaaac tcctgggctc 70260  
 aagtgatctt catgccttgg cctcccaaag ttctgggatt acaggcatga gccactgagc 70320  
 ctggccaatt tgtatcttgt aaatgcatat gttctgaaaa ttatgattaa aatataatca 70380  
 tagattaaaa catgataatg aaacttacga tgagatattt ccttcaaatt tttggtttta 70440  
 gtggcggcat gattttgtgc acggatggat aaaagtacct gtgactcatg aaacacagga 70500  
 agaatgtctt gggatggcag tgttagatat gatgagaata gccaaagaaa acgatcaaac 70560  
 cccactggcc atctataact ctatcaggtat attttctttt gcaaatcctt acacataagt 70620  
 gtgagtagag attttatata attcgtatat attttctgtg tttaccctatg ccttttgatt 70680  
 ttgtaatact agttaagtac tccttatcta aaatgcttgg aatcagaaat gcttcagatt 70740  
 ttggatattt ccagattttg gaatattggc atgaactta ccagttgagc acccctaate 70800  
 caaaatgctc taatgagcat ttcctttgaa catcatgttg acgttcaaaa agttctggat 70860  
 tttggaacat ttcgtatttc agatatttgc aagagggata gtcaacctat aataaaaaat 70920  
 catatgggta agttttatat ctggggagta aaacacactt tgtaagggtga aattatttaa 70980  
 agagttgtac tacaggaat atcataggta ttaaatactt attatttgat ttcatttatt 71040  
 ctgagaaggc tagggaagt cagaggaaca gaagaaacac ctggaggcat actttttgat 71100  
 agaagatcct ccagttggct atataaatga cctgaataag tatttcccaa atgggtggtg 71160  
 atattttatt tgcattagac tcacgtgggg gagcctgtta aaatcaaaga tttctgggctc 71220  
 ctaatccaag agatttgat tcagtaaate tgagttgaag cccacaaata tgaattttta 71280  
 cagatgctct aggttattct tatacaaatg gtccaaactc tgcattcttc aaattattct 71340  
 tctgcatatt gaacttgaca atcatggcta atataaaact gctttttaaa aaggatata 71400  
 taagaatggt ttaagtttga aggcaaatat gtattttata tattacatac tcccagatt 71460  
 aaaaatttga gtacatcatg agtgtgggta aagcttcctt ttttgaaatt gttctcccaa 71520  
 taactggcct cagtcatttc tttgccatgt catcaaaaca gttacatacc caatttgcag 71580  
 agtatcaatt tctgtatttc tctctttggt tttaaatatt cttgttttac tttcagatgt 71640  
 ctgttaggtc ttaacctaaag ggtgtaggcc ataggtata attttaggaa ctcagaaate 71700  
 tagaagatc caaagcccaa aggaaaaaaa aaacacattc attcattcaa cagctactta 71760  
 ttgaatactt gctgtatgcc aggctatagt agaacatagt tggaggaaga gtatcttaga 71820

ES 2 535 178 T3

tgtcgttaca tagaaactga aggaattcag gggaacacag ttgaagaaca gaagctttga 71880  
 cccattgaag atgaatgta taaatatgaa gccatcteta gacttaagct atcgtggaat 71940  
 atttctgctt tggaaacat gctgtcatcc aaagtcttgg cacaatcttt ctatgtagat 72000  
 tgtagtttct tccagtttga gaatcatgtc atctattgct cttatcceta cattatntag 72060  
 tctagtgtcc taaacctaat gactatntag taactattta tctgattctt ttaactcatg 72120  
 ctcttagcca ggatataaac acagatgcaa aatgctgcat cttttttttt tactgcttta 72180  
 ctttaaaaat agtgtagata ttaaaccattc atataagatt ccatgatatt ttaaagagt 72240  
 ttattgagat aatttacaaa tcataaatct caccattta aaatatacaa tttaatattt 72300  
 tgtattatat tcacagggtt gtataaagat gaccagaatc taattttaga acatttgc 72360  
 cctttctgaa agaaacccca tgcccattag cattcagtc tcatcccact tccccccagc 72420  
 ctctggaaac cacttatctt tttgtttgcg tggattttcc tgtctcaaac atttcatata 72480  
 aatagaatca tgcaaaatgt ggtgtggcat tttttttgtc tggcttcttt cacttaatat 72540  
 gatgtttcca aggttcattc atgtttaga atgtatcagt acttcatttc tttttattgc 72600  
 tgaatcattt cattatatag atataccaca ttttgcttat ttgttcttca cttgatgaaa 72660  
 atgtgggctg cttccatggt ttggctattg tgactaatgt ggctatgaac agttgtatat 72720  
 gagtaatttt gtggatgat ttttttcat ttttcttgtg catatattta ggagtggaat 72780  
 tcctggaaca tatggtaact gttaaacttt ttgaggaact gcttaacttt tcaaaagcag 72840  
 ctgtgccaca ttacattcac actagcagta catgaagagt tccaactctt tccgcacttg 72900  
 tttctgtctg tttttatcc atcctagtgg gtggaagtgc tgtctcattc tagttttgat 72960  
 gttcatttct ctaatgacta ctgatgtttg gcatcttttc atgtactttt tggccatttg 73020  
 tatgccttct gtagagaagt gtctatttga attcattgct ctttttttaa ttgggttatt 73080  
 tgtcttttaa ttattgagtt tagaaaattc tttttatatt ctggatacaa gtctccacat 73140  
 ataatcatat ttatgatttg ccattatttc ctcccattct gtgtattggt attttacttt 73200  
 cctgaaggta tcattttag caaaaagtt ttaattttga agtagtctaa tttgccccat 73260  
 ttttctttgt gtcttgtgcc atgtggaat gtggttttag caacatggat gtctttcttg 73320  
 gttttagcaa gagcagtttc tcttgaata atggaacaga agccaaactg gaatgagttg 73380  
 agggataaat ggaaggcaag aaaatggaaa tggctatgta catgctttca aaaagaggcc 73440  
 agataggctg tggccagaag gaaatgtggg attaagagat tttacatttt atacgggacg 73500  
 gacattaatt tagcaagtcc tttgtgcctg tggattctac atctaataatg ccacagaatg 73560  
 aggtccagaa aggttctctg gattagatgg tacttgagcc ttgtcgaatg agtaactaga 73620  
 taggagatgg atgattggaa gaaagattag catatattac ggcatggaaa attatttaat 73680  
 ggtacttcag aaataaaatg ttccttagaa gcacagaaat aaattacctt ctttagaata 73740

ES 2 535 178 T3

ttgtacatag agatgaatgt acagaaaagt cagaatattt ctaaattgaa ttgttttgat 73800  
 cacaaaggaa ttattaggag ttgaagctgg cctaacaaaa taatatacag aagtatgttt 73860  
 gcataatgaa aatggcttcc aacaaaatgt aacaatttcc aaaattcagg taaatgttgg 73920  
 agcacagcat cataggaaat atttgtagca cagttcaata tatgccaaaa tattatctta 73980  
 taaaccatta actctggtat gtgaaataga gaaaaggaa ttttagagat tcttattaac 74040  
 tagactgagg attcatttca ttaggggaag aagattaaca tcttcttttg taaacattga 74100  
 tgataactta gagtgtgtgg atatatatt atcatcaaac aaaatcttaa agttttatatac 74160  
 tgtatggatg ggggttatgt caacttacgc cacttgGCCa ctgtgttgta aggcctactt 74220  
 aatcatggaa aaagggtgta acttcttttt caatttttag atttatcttc caatttttgt 74280  
 tttgttttgt ttttctgtat gtgctttttt atccctagct acaagacatt cttacccaaa 74340  
 tgtattcgag caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtaacaga 74400  
 tttcgcagat ttattcagca attcagccaa tgcaaaGCCa ctgccagaaa cttgaaactt 74460  
 aagtatctta taaatctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaagta 74520  
 aaagaacctg gaagtggctc ttcagggtgag gagatttttg caaccattat aataactgga 74580  
 aacggtgga ttcagtgtc aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag 74640  
 gtaatcctta atgatatgtt cttgttcttt gtatttttaa gtacaatgga aataaaaaca 74700  
 aagtaatttt aatcatttgc aacatggtat tgcacttctc ccatttgata gaagtggaag 74760  
 tttttaatag cgtgaaccta tcaaggctat ataattcttt gcctactatt cttaaatggt 74820  
 tttttcattt aattttttat gacaaaataa ttaccaatga ctatattata gtttcagaaa 74880  
 gatgtcaaat tctaaaagtg attttaaagg agttttgcct ttcactacta gtgataacag 74940  
 aaggcataat tataaaactt gttactaga aaagattgat attaatgat tttatgataa 75000  
 tatataacctg ctaaataatg aatttatatt aggtttgcat tgcaagtttt gaatttgta 75060  
 atatccgtgt tgttcataga ttgttactag agatttagag ggatcatttt ttaatttttc 75120  
 atctttggta gtcacatttc cagttttctg gcagtggttt ctactaatgt taattgaatt 75180  
 gaagagtgcc atagcacatt ttagattcct gccatcattt aatgccctca tttttaagtc 75240  
 aagcaagata cagcatagtc ttagggttag atgatagag taaatcacgt ttaatgctta 75300  
 tctattgta tcaatacctt ttttatttta aagaatttgg aaagaatgtt gtcttcttaa 75360  
 gtcttgtttt aaaatggctc tgtaaattct acccgttttt aattttacat gcttttaatt 75420  
 ataggattta cagttatatt gcgattttcc taatattatt gatgtcagta ttaagcaagc 75480  
 aaaccaagag ggttcaaatg aaagccgagt tgtaactatc cataagcaag atggtaaaaa 75540  
 tctggtaagt ttgctttatg attgaataat ggtttcattt tatagttctc agaaatgtgt 75600  
 attttagaat cttagtacca aaattatttt ctggtaggaa ttttgattgt agttttaaat 75660  
 ataactctaa acatcagttc agtaaaactt ttgataacat ctagcttttt gtattactat 75720

ES 2 535 178 T3

caacaccatc ttcctacaga gtttcttgta cactactgta ctttttttac tcatttttat 75780  
 gattagcaaa gcaccagtta ctttctcccc catccctact ctagattata ctagttctct 75840  
 gatgtaatgc tcaccctga ctaaaatatt ttatcaacag ggatgtatat gtgccagtta 75900  
 tactgcctaa ttaaaggaga aaaaataaat caatgatgtc tggaaattat ataacaaaat 75960  
 gtaaatcaat cccaggtcag ccccacccaa gctgtaggac atggttgatt ctaaaagatt 76020  
 aacgctttct ctttttttaa atagcttcag aaatctaatt tattttaatg taaataggag 76080  
 aaatgaatta ttttatactt tgctcttaag tttctcattt atcttctctg tcttcttttt 76140  
 aactcagatg cttcttgacc cttcctggct taaactagtc ctattaatgt tatttgtcta 76200  
 tttatcttaa gtatttatat ggcttacctg tctggctggt ccagggttat attacaaaa 76260  
 ttgtaactaa cttgcaactc acttaattca gcatagtttt ctgttcttag ataaaaatat 76320  
 gatagtacac ctactgccta gtagactgtg agccttttga aggtaaggat cataatttta 76380  
 tgtgtgtttg taccctctac accttgacaca gtactcaggg cctagtttag aaaaagcttg 76440  
 ataaatattt tatggatgca taaaaggatg attaacaatt atcaacctca atgtggatat 76500  
 ataataaatg tttctgggag agtttattga tcttaatgtg aacaaactgt agtaacccaa 76560  
 agaacttctc catgggactg tatttgact tggttaatt ttaagtctgc aatacagaga 76620  
 agttaagtaa ctttccaagg gcacagtgtt agttaagtgg tagggctatt taaactcaaa 76680  
 tgcatgcttt gaaaacctaa gctcttaagt gtgacactaa cttctttgct aagtatccgt 76740  
 aaagctcctt aaaaatatta tactgacatt ttgttggaat tgtgcaacaa actgggaaga 76800  
 gttgacattt ctttctcata ttaaattttt tattttaggg atacattgta tttctccttg 76860  
 tatacaagta ttattttatg tttttcagta attcttgatc attttattca tattgataca 76920  
 tcatgtttct tgctgaattt tattcatgat atgttatgct tttctgttg tttattaaaa 76980  
 ttaatacttc ttctctgtgt attttctac caaattattt atggatatag gaaagtaatt 77040  
 tttgcttatt attgcathtt cccagtgtat tatgtgttag taacattttg ttttactgt 77100  
 cattttctc ttcatctgg catttatttc tctttataat tttggtaaaa tatatataaa 77160  
 ataaaattta gcactttaac catttttaag tgtacagttt agtagtgta agtatattca 77220  
 cttttgcac caatttccag aactctttta tcttgcaaaa ttgaagtcta caccattaa 77280  
 ataaaaactc accatttccc cctcttccca atccttgcaa ccagcattct actttctttt 77340  
 tttttttttt ttttttgag atgagcttg ccctgtcatc caggctggag cacaatggcg 77400  
 cgatcttggc tcaactgtaac ctgtgcctcc tgggttcaag caattttcct gcctcagcct 77460  
 cccgatagct gggattacag gtgcacgcca ccatgcttgg ctaatttttt gtatctttag 77520  
 tagagacggg gtttcacat gttggccagg ttggtcttga agtctgacc tcatgatccg 77580  
 cctgcctcat cctcccaaag tgctgggatt acagggtgta gccactgtgc ccagcccctc 77640

ES 2 535 178 T3

tactttctta ttctatgaat ttgactactc tagatacctc ataaaagcag gctgaaacaa 77700  
tactgtcttt ttgtgacagc cttatttcag ttagtataat atactcaagg ttcatttgta 77760  
ttacagcatg tatcaatttc cttcattttt aatataatgta tgtattctgt gtcattgata 77820  
taccacattt gttcattcat ccatcaatga atattcaggt cactttttta ctttttgaca 77880  
attgtgagta atgctgctgt gaacatgggt gtacaaatat ctcttgaaaa ctctgctttc 77940  
aattcctttg gatataatcc ttctattagt ccgttctcac actgctataa agatactacc 78000  
tgggactgga taatttattt aaaaagaggg ttaattgac tcgcagttcg gcatggctgg 78060  
cccaggaaac ttaaatcat gccagaaggt gaagggcaag gaagccatgt cttacatggc 78120  
agcagaagag agacagtgtc caggggaaag tgccactttt aaacctcag atctcatgag 78180  
aactccctca ctatcatgag aacagcatgg gggaaacaac ccccatgatt cagtcacctc 78240  
ccaccatgtc cctccctcga cacatgggga ttacaattaa agatgagagt tgggtgggga 78300  
cgcagagcca aacctgtca taccatagaag tagaattgct ggatcatatg gtaattctac 78360  
ttgtaatttt ttagggagcc accatgctgt tttccatagc agcggcacca ttttacattc 78420  
ctaccaggag tacattctcc acatgctcat caaaacttgt tattttctgt tttctgatag 78480  
tagccatctg atgggtgtga agtagtatct cattgtgatt ttgattcaca tttccctaat 78540  
gattagtgtt gctgagcgtc ttttcatata tgtattgcca tttgtatata ttctttgaag 78600  
aaatatatat tcaagtcctt tgctcatttt ttaatcaggt tttttttgct gaattataga 78660  
aattattttat gtattctgga tattaatccc ttttcaaata tatgatttgc aaatattttc 78720  
tcccattcca tagattgctt ttcactatgt tgcttgtgtc ctttgatgag cagatgtttt 78780  
aaagttttag ctagtccaac ttttggtgcc ttttttctt tttactttgt tgagatataa 78840  
catgaaccca gtaaagcaca ctaactctac gtgtatagct caatgaattt ttacatattt 78900  
gtacatcttt gtagccacac ccacctcaa aacagaata gttctcttac tcctagaagg 78960  
tttccacatg catcttccca catattcacc tccacccta acttaagata cctatcatct 79020  
accatcactt agttttatct attaataaag gttgtataaa tggaatgata ctgtatgtat 79080  
tcttttaaaa tctagattct tttagttagt ataatgtttg gagattcatt tatgttgta 79140  
catgtgtcag ttcattcctt tttattgctg ggtagtattg aattgtttga ctgtacctca 79200  
aattttaaat gtattctgtt gatggacatt tgggttgctt tcactttggg gattttaggg 79260  
ataaatttac catgaacatt cttatacata ttttttggtg gacttatgca ctctttttt 79320  
gtatatatat atcctagaga taggattatt gagtcatagt gatagcttta gtatactgcc 79380  
aaacaatttt ttgtagttct atcagttcac tcttcttca gtaatgcatg aaaattacag 79440  
ttgtctcata tccccatcaa ctcttaattt tgtcagtcta aaaatgtctt agtttgtctg 79500  
gtggatgtgt actggtagct attgtagttt ttattttcat tgccctgggt agtaatgatg 79560  
ttcaactctt ttcacttac ttattgttca tctgaatata cttcttatga agtgcctgtg 79620

ES 2 535 178 T3

acagtctttt gcacattttt cattgacttg tccctttctg atcaatctgt agagtctcta 79680  
 tagattctaa gtcttttgta ggatgtttgt aaaacgtata tagacatacg tcagagatat 79740  
 ttctagttca gttctggacc actgcaataa agcaaatttt gcaatgaagt gagtcacata 79800  
 aattttttgg tttctcagta catataaaag ttatgtttac actataatca agtctactaa 79860  
 gtgtgcaaca gcattatgtc ttaaaaatta atttaaaaca ctttattgct aaaaaatcct 79920  
 aatgataatc tgagcctcca gagagttata atctttctgc ttatgagggt attattttga 79980  
 tgttgatggc tgctgaccga tcagtgtggt ggctgcttaa ggttgggttg gccaaagcaa 80040  
 tttcttaaga taacaatgac atttactgca tcagtagact cttcatttcg ttaaagttgt 80100  
 ctctgtagca tgtgacattg tttggtaaca ttttaccac agtagaattt ctttagaaat 80160  
 gagtcagtcc tctcaaacc tgccactgct ttatgtacta aactttatc taaatcctt 80220  
 gctgtctttt caacaacatt cacagcatct tcaccagga ctagattcca tctcaagaaa 80280  
 ccattttttt atgcataaga agcaacttat ctgtccaaat tttatcatga gattgtagca 80340  
 attcagtcac atcttcagct ctacttctaa ttctagttct cttgctattt ctaccacatc 80400  
 ctagtgactt cctccattga agtcgtgaac ccctcaaagt catccatgag ggttggaatc 80460  
 aacttcttcc aaattcctga taatgttaac actttgacct tcttccatga atcactgatg 80520  
 ttcttctctg catcaagaat ggtgaatcct ttccataagt ttttctattt acccagctcc 80580  
 atcagatgaa tcactatcta tggcagctta gccttacaaa atgtatttct tagataataa 80640  
 gacttgaaag ttgaaattac tccttgacc atgggctaca gaatggatgt tgtgtcacca 80700  
 ggtctgaaaa taacatgaat atccttgtac atctctgtca gagcgcttgg gtgaccaggt 80760  
 gcgttgtaa tgagagtaat actttgaaag caatctttt ttctgagcag atcttaacaa 80820  
 tgggcttaaa atagtcagta aaccatgcta taaacaatag atgtgctgtc atccaagcct 80880  
 tgttgttcca tttatagagc acaggcagag tagacttagc ataattcgca gagccctggg 80940  
 attttggaa tggtaaatga gcgctggtt gaatttcaag tcaccaatgg cataggccct 81000  
 tagcaagagg gtcagcctat cctttgaagt ttgaaggcaa gcactgactt ctctctcta 81060  
 gctgtggaag tcctagatgg catattcttc caacagaagg ctgttttgtt tacatttgaa 81120  
 aatctgtttg ttagtgtcac catcttcac aatggctcct actagatctt ctggataact 81180  
 tgctgtagct tccacatcag catttgctgc ttcacctgc acttatgctg tgcacatggc 81240  
 ttcttttctt aaacctcatg aaccaacctc tgctagcttc caacttttct tctgcagctt 81300  
 cctcacctct ctcagccttc atagaattta agagcattag ggtcttgcct tagattaggc 81360  
 tttggcttaa gggaatgta tggctggtt gatcttctat ctagaacttt ctctgtatca 81420  
 tcaataaggc tgttcacttt cttataattt atgtgctcac aggagtagca ctttcagttt 81480  
 ccctcaagga cttttccttt ggattcataa cttgcctttt tagtgcaaga ggcctagctt 81540

ES 2 535 178 T3

tcagcgtgtg ttggctttca gcatgccttc ctcactaagc ttaatcattt ctagcttttg 81600  
 atttaaagtg agagatgggt gaatcttcct ttcacttgaa tactcagtgg tcattgtagg 81660  
 attattaatt ggcctaattt cattattggt gtgtctgagg gaatagggag gcctgaggag 81720  
 agggaaaaag aaagggaaat agctattcgg tggagcagtc agaacatata caaatttatc 81780  
 acttaagttc accatcttat ataggcccag tgtgtggtgc cccaaaacaa ttacagtga 81840  
 cccttgaca tcacaggttt gaattgtgtg ggtccactta tatgcaattt tttttcagcc 81900  
 aaacatggat ggaaaatata gtattcacag gatgcaaac ctgcatatgt gtagggctga 81960  
 cttttgcat atatgggttc tgcagggctg atttcagaac ttgaatatgt tcagattttg 82020  
 gtatatgcag gggctctgta actaatcccc ctgtattctt gagggacaac tgtacaatag 82080  
 ttacatcaaa ggtcattgat cacaaatcac cgtaacaggt ataatagtaa taaagtttaa 82140  
 attttgtgaa aattaccaa acatgacaca taggaagtaa gcatatgcta ttggaaaaat 82200  
 tgcaactgata gacttgact tgcctcactt aagtttgtca gaaaccttc atttgtaaaa 82260  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaggt catatctgca aggagcaata aagggagtg 82320  
 cagtaaaaca aaatgtgtct gtatatcaat aagagggata ctagttagtg aactgctagt 82380  
 tcaaagggtg tgaatattta caactttgat agattattaa aatacttctc aaaaggtggt 82440  
 tccaatgtat ctgtacacct gttttcttgt atcctttgcc aacactggat gttatcaatc 82500  
 ttttaatttt tctgccaaat caatgggcaa aataatgctg tcctgttata tttcatttcc 82560  
 ttaattagaa cctgagattg agcaatacct catgtgttta taggtcagct ttaatattta 82620  
 tacttctgtg gattgccttt tcatgtcctt tgactagttt tcttttttta tttttaattg 82680  
 ttttatacgt tttattcca caatgtatgt taggtatatt cctttgttat acatgtttgt 82740  
 aatctccaag tcttttaatt ttgttttagga taccttttat agtacttgtt tttttggcta 82800  
 tttgtgttag ctaaatacct tttatagttc aaacatgtca catgcttgtc tctttattat 82860  
 aatttttggt tgaggactct attctgtggt ctctttatga ttatgtaaat attgttcatt 82920  
 gctgggcaa gaaatatgct gtaatcacat tttcgttctt atataacttt tccaggagt 82980  
 taattattgc tttatgattt ttcctttgta tctagcttta ttttcatttt ctacaagaac 83040  
 tctgtaaagt agtggacttc tcaatacaaa atttcacata atcaaacctg tcatatatga 83100  
 tagcattttt acttcttttc tggagaagta cctcttcgat cacagcatct tactttgtag 83160  
 tgtggactgg aagttttctg ggtacagcta ttattttgtc agctgtaatt tttggtcatt 83220  
 cctttcttat cctggtaact atgttttcat ctctcttata ttggatctga ttttctaaat 83280  
 ctcagtttg cctgttttt ctaggtaacag cctctggtat ttgttggtat ctttaatgtg 83340  
 attgagacaa attagaaaat taatttagag aggattttta catttttatg atattgaatt 83400  
 ttctaccat ggttaatctt ctatatattt aaataaaaag ttgcataaga gtgttttgaa 83460  
 gtttttgta attattgata ttgcatctc tttgttacia atggggcttt tttcattata 83520

ES 2 535 178 T3

taactgactt tttgtatgta aaaatataat acgtctatat attttcccat gtaagtaaca 83580  
 tgctgcattt ttggctgact acatgttcac atatgtatta agatacaatc aggccgggca 83640  
 tggtgactca cgcgtgtaat cccagcactt tgggaggcca aggcgggcg atcattaggt 83700  
 caggaatttg agaccagcct ggccaacatg ttgaaactct gtctctacta aaaatacaaa 83760  
 aattagccgg gcgtcttggc gtgtgcctgt aatcccagct ttttgggaga ctgagacagg 83820  
 agaatcgctt gaaccagga ggcagaagt gcagtgagcc aagatcgcgc cattgcactc 83880  
 cagcctgggc gacagagcaa gactctgact gggcgggggc cacaaaaaaa tcatagcata 83940  
 gctacatatc ctaacathtt agttttagc atgaatactt tagcagtatg taattgggat 84000  
 gtagggctga tgccgtggct cagcctgta accccaacac tttgggagac tgagggtgggt 84060  
 ggatcacttg aggtcaggag ttggagacca gcctggcca catggcgaga acctgtcttt 84120  
 actaaaaata caaaaattag ctgggcatgg cggcatatgc ctgtaatccc agctactcat 84180  
 gagggtgagg tgggtggatc gcttgagcct gggaggtgga ggttgagtg agccaagatt 84240  
 gtgccagtgc acttcagcct gggcgatgga gcaagactct caaaaaaaaa aaaaagaaa 84300  
 aaaggaaatg ctcattgatt ctaatgtcaa cttttatata atattaaata gatttctagc 84360  
 tgagataact ggtatattag tctaagaagg acattgaaa ataaagtaaa atgatggcta 84420  
 tagagtgaac tataactggg aaggatgat aatctgtatt taggaggatc ttaaatatca 84480  
 gacatgagaa tttgtaattc atattgagta ctgagccata aaagatatga gcaatttga 84540  
 agaaaattgt atttaacatg gaatgaagaa aattttcaat atttaacatg gaggttgactt 84600  
 tctaaaaggt gctatttctt tttcttttct ctgcttagga aattgaactt agctcattaa 84660  
 gggaaagctt gtctttcgtg tcattaattg atggatatta tagattaact gcagatgcac 84720  
 atcattacct ctgtaaagaa gtagcacctc cagccgtgct tgaaaatata caaagcaact 84780  
 gtcattggccc aatttcgtga gtaatacaga cttaaaagta aatttttaga aaagtaaatg 84840  
 ctgtatttac aaagaagatt taacagagtg atacatgat gtttagaaaa aaataatttg 84900  
 acaagttttt tttaaacaaa aggctatttg caatcagatt acataataat tagaattatt 84960  
 tagtgataaa tttaccatct gtatcccaat ctataatatt tataagttgt acaagtttaa 85020  
 catttgtaa tcatgcctat gtgtgattca ctctgcatg ttactaaaaa agaaagatct 85080  
 ccaatttatg ttttattaat tttaaaatac tgcaaggaag ccacagtgca aaatttgaaa 85140  
 attctttatg tttggatagt ccatctcctt ctactgaaag gttcaaacac aagatatata 85200  
 tgatgtccac atttctagac tagtgctatg tagaacttcc tgcagcgatg aaaatattct 85260  
 atatctgtgc tgtgtaaacac agcagccact agctacatgt ggctgtttag catttgagat 85320  
 gtggctaata caaccgagga actgaatttt aatttaattt taatttcttt acatttaaat 85380  
 agctacatgt ggctagtaac taccacattg gctcacacag ttgtagatcc ttactttaat 85440

ES 2 535 178 T3

actgggtaaa gctagctatc atgcataaca tctatattagc ttaagtccta atgatctctt 85500  
agctaggatg tggtttatgt tgacaacaga tttgaataac tcgagcaaag ggaaaatctg 85560  
ggatcatgag catattatgt tctttgcatt taacctacc ctaaataattt gagaaaatac 85620  
atcttgggta atataaagag ttgatttagt ctatgcttaa tatttattta gtaatgaata 85680  
ttgttgctat gaaaagtgt tactacttga actttatgtc tgtaatttac atgtttaata 85740  
tttttaaac tccttgcctt tattcatgta tccataaatt cattcaaaca ttcttttatt 85800  
tatatttact gagtaactac tatgtgcaag cattggtttg tatattagaa atatggtgat 85860  
aagtgaacaa gaatgattct ttcttttgta tagattatat tttgcttttc tttcagggtg 85920  
tgcagcttca gaaaacataa aaaattttaa aaaccagtag tctttgtcag ttgccatggt 85980  
tcttctctta gactttgtta tcgtactgaa taataaaatc atgcattcag atttttatgt 86040  
cagtaactgc tatggtagta gagatataag tattttctga tatataatct ttatagttaa 86100  
atgaaggttt ctgagagat ggttttaaaa atattaactt tgtaatcagc aggcagaaaa 86160  
atcaaatgaa caaattgttc tttgtgattt tgtcttataa atacctttta ttggttttta 86220  
aagctatata attgtccctt gaagtggttt gaacttactg caaaatagct tgggtactttg 86280  
atttttcct ttgaaagatt attgctaac atataaagta gaggagacaa ttctgcagct 86340  
tttagatttg acttttgatt gttttagatg acacttggtc ataataattat ggtgcttgat 86400  
atattattca aattgcttct tctttacctt taggatggat tttgccatta gtaaactgaa 86460  
gaaagcaggt aatcagactg gactgtatgt acttcgatgc agtcctaagg actttaataa 86520  
atatttttg acttttgctg tcgaggtag tatgtcacac ttattagtgg taacacttta 86580  
tttagttcat ttaatttcct ctccatattt atttaccata tttccttttt aatactgaga 86640  
attatagctt tggatgatg aactagtata atgcttaatt tcctcagaga ttctgtacaa 86700  
ataaacaagt tataattccc agggtttata taaaaatata aaataattta taatgtctat 86760  
ctttttattt tgcatttatt ttattttctg atgttttggt gttaccagtg tgttaaaagg 86820  
tatttcatca agtgtcttga tgtttctttg tttgcaaac tggaaatctt tgccacatca 86880  
tgtagaacia aataaatcgg aagcaaattt tctgtttatt aacagtgggt gcagaattag 86940  
aggaaacaga attagagaaa actaggtcaa taacaaacia atagaaacat taaagcactt 87000  
ttaactgatg attttcta atttttaaga atagtggctc acaatgcatg tttcaacggg 87060  
aaaactgcaa tgaacccca ctgttaatac agatcatttt ggatctcatc tatgattata 87120  
tactatcact tatgaggcaa tttcatggta taaatcctaa gaaactatag aagcttgcaa 87180  
atztatcttg cttttttaa acagagaaaa ataagaactt tgttattcaa ttattttaat 87240  
ttttataaaa tgcaacttat atttggcata tgtagagggt agattactta cagaaggag 87300  
gttatgcat cactttacct ttgtgtaaaa ctggtaatct atcctaattt caaagtatcc 87360  
tgttactata acagataata gtacattata ttcaagtatg aattcaaaaa aatatatata 87420

ES 2 535 178 T3

tatatatttat gttcactgta tgtgcccaagc ctaatatgag agctatgtat tatagagttt 87480  
atgctacagc cctaccttca ggaaacttat ctactggaca aacaaaaatt ttcaaatata 87540  
caaaaaattc taaatcgaac attgtaatta tctagcatag gcaaatatag acagtaacag 87600  
acaggtttac aattattaag aaagggcagc caggtgtggt ggctcacacc tgtaatacca 87660  
gcactttagg aggccaaggc ggggtgatca cgaggtcaag agattgagac catcctggcc 87720  
aatgtggtga aatggtgaaa ccctgtctct accaaaatta caaaaattag ctgggcatgg 87780  
tgggtgcgcac ctgtagtccc agctactcgg gaggtgagg taggagaagc gcttgaaccc 87840  
gggaggtgga ggttgacagt agtcaagatt gtgccactgc actccagcct ggcgacagag 87900  
cgagacacgg tctcaaaaaa aaacaacaac aaaaaaaaaa aaaaacaaga aaggttattt 87960  
ggcataggaa gaacctgatt gaccttgagg tattggtaga ttttatataa atgtttctga 88020  
gtagaatgaa tatgtttata aaatgcacct taaaaatagg tgaacaagtt cataatatag 88080  
tgcataagac aaatatttaa aaactgcaa atattaaaa tgtaatatta aagataatta 88140  
tacaaataca atgggtggtgc agtggaatgg ctgtatgttc acctttgctt gtgcaaagag 88200  
gtgagcatta gagaggacct cttagaaaca gtggtacttg aactgagttt tgatgaatga 88260  
ataaaggttc attgctcaga agaagtgggt atacattctt aggtagaaag atagcatgaa 88320  
gaattatcaa ggcataagc agcatggcat ttgcttgaaa tgatttaagt catttaatat 88380  
ggctggaacg taggttgtat gttggcagt gcaggagctg agattggaga tggaggcaga 88440  
aaccagctca tggaaggctc tatatgctac atttgtttta ggctttatct tataaatgat 88500  
ggaaaactat taaggatggt attggtgcta ttaattatca ttgccttctt acatgctttt 88560  
tcataaaatc aacttttaa ccacttttgt aggctgagaa attgtaaatt gcccttttga 88620  
ggaactaagt acttctatca ctatactggc actacatcgg attcatggtt caaatgttta 88680  
ttctgttgct tgttcttgct atatcatttt gtcagaataa tcaactgtgat gtccattgtg 88740  
actatccctc cctttcttta taattaaact tatacagcga gaaaatgtca ttgaatataa 88800  
acactgtttg attacaaaa atgagaatga agagtacaac ctcaagtggga caaagaagaa 88860  
cttcagcagt cttaaagatc ttttgaattg ttaccagatg gaaactgttc gctcagacaa 88920  
tataattttc cagtttacta aatgctgtcc cccaaagcca aaaggtaaga taattttcta 88980  
gttattttta aattactggt catggattgt ttatgtggcg tgaagtatct tcagtacatt 89040  
gatttcaaag gatatatgaa agaagcagct ctaaaagtta attttatctt attctattgt 89100  
acaagcatca tcaaataaga ttgtttactt tggttttggt ggtctagaag tgacttgaag 89160  
ttcaattatt ctaaaatgag attttaaaaca taatgtgtgg tatgatgtca tttattgaac 89220  
tggaagatct cactactaaa ttcttatgtt gttttaagta aaaattttca tatacttcga 89280  
ggattttaat ttctgtattt taaaaataaa gacagtaaag ttggaaattc cttgaaataa 89340

ES 2 535 178 T3

tgagccttac tattaaaaat tattaaaatt cctgaaaaat tgtatgagtt aaggaagtta 89400  
 ctataatltt gaattaatga aataactggc aggaatacat caaaatcca attacattag 89460  
 ttaaggaagt gattataatt ttgaatgtat gaagtaacta agaagaaata tcaaagttca 89520  
 atgagttgac ccctaaaata attttctatt ataaaaaaag aacaattagg agttattaag 89580  
 catttcttat acgtagaaca catttcatltt tactcctcct tggagcaatt cataccttca 89640  
 gtgtatlttg aagtgatata tatgtatltt atlttttctag ataaatcaaa ccttctagtc 89700  
 ttcagaacga atgggtgttc tgatgtacca acctcaccaa cattacagag gcctactcat 89760  
 atgaaccaaa tgggtgttca caaaatcaga aatgaagatt tgatatttgt aagtcattag 89820  
 atactcatta ctgtcctltt tgctccttca aaacaacatc tgtlttcttg atttacattc 89880  
 atgtgacatt ggaattatltt tgttatatac aaatlttagtt gtgatttaaa tatltttctt 89940  
 atgaaaaata tgccaacctt gtgttagatg ttagcaaaat taattatcct aattatccta 90000  
 agaatggaat cttaatlttc tlttttgaaa tttaaaaatg attcctcaca aatctcaaat 90060  
 taaaaattaa aaatctaca agacctatat cgcaactccc aagttctca gaaagtaagg 90120  
 gaaattcaag gggttaaaaa taaagaagaa actgagaaaa aaatccagcc atctctcagt 90180  
 gtccatgagg gatgtgttcc aggactacct atggatacca aaatctgagg atacttaagt 90240  
 ggaacctgtg gatatgaaaa gttggccctc tatatacatg ggtlttgcat cctatgaaca 90300  
 ctgtatlttct tlttttaaat aactaattat tlttttaaat tatlttatla tttattagag 90360  
 caggacttgc tgtgtcaccc aggtgtgaat gcagaaatac tatatlttcc aactgagttt 90420  
 ccttgcagat gcagaacctg cctgtccagt acagagggcc cactggattt attgaaaaaa 90480  
 acccacatat aaatggacct gtgcagtcca aacctatgct gttcaagggt caactgtagt 90540  
 acataagatc tgataatctg gcagtcaggt ggtgagggtt gatgatcagc cacatlttatc 90600  
 aagggggtta agatttaaga gcaatlttaa agggccaggt ctcagacctg tgcaaggcca 90660  
 cgagttaaaa gtgagactat ccctgagtaa aaccaggaca cttaagtaa tacatcctca 90720  
 gtaaaacaat atatagaatg tgaaaaatc acctactagc aagcagagaa gaaaaggaat 90780  
 attgtcattt ttaactgcgc ttctgggtgag gaaaaggagt ctctcctaag aatltgtcat 90840  
 cataagcttt ggaatlttggg cttcattata ctacctacat agactgagaa atcctaatt 90900  
 aaaagtggta ctctcctaat atgtgtgtgt gcttgggaaga aacaaaaaaa tctlttcgga 90960  
 accacatact cttaacctag gcaaccata attcccacag ataaaagcat tgcaaacaca 91020  
 agctlttlaat agaaaattta gaaacataca aggaaataat gcaggattaa ttaagagtca 91080  
 gttagaccaac aaacatcaaa attagaactc caggaacttc ctatcacaga atlttctagat 91140  
 acagactata aaatacatat acatgtltta agatagaaaa ggaattgaaa ccacggagaa 91200  
 ataacaagac attgtltttaa caaacaaaa agatgtcagg aaaaaggcat agaaatgata 91260  
 aatatlctca ttgacattaa aacagaatat acaggatgaa aagtaattaa ctatagctg 91320

ES 2 535 178 T3

aagagagatg tagtgaacct caagacagat ctgaagaaat taagaatgca gcagttaggg 91380  
agaaagaaat ggattatatg aaagagggat taagtggcat ggaaggcaaa atgagaaaga 91440  
cccaactcat atctgagctc tataaggaga caatagatag aattagccag aatggtaaag 91500  
acaagcatct tcatgtgagt aacaggaaac agagtggcca ggtaacttga ctaacattac 91560  
aaatctaata aatagtagac cttggatttg aacacaagca gccttactgc agagtgcagg 91620  
ctttcaacaa ttactttgta aagatatgca agaaatacta gtattagtag taatagctga 91680  
tacttaatgc acatttacta tgtgtcatgg actgtgetaa gtgcttttat gtattttatc 91740  
acttattgat cataacaatc ctatgggaaa atagttatta ttctcatttt tcagatgaag 91800  
aaaccacgac agctgcagca cagagattaa atagcctgta caaggtcata caagtggtaa 91860  
taagagaaag tcagatattc tgccctctgca gaccacattc tctagtgtgc tagtaggaaa 91920  
ggcaaagaaa atgattccca tgtaagcaaa tgtaggtaaa cactgactct atttttaaaa 91980  
agtgacaatt atagcccatt caggagattt caaaaccgag tagagccaaa atacacttaa 92040  
ttcattaatc cttgttttct gtctcttatt actatttaag gaagcagaat aaaagcatta 92100  
atgtggagtc ttaaactctgg atttagattc taaggaaaa acttgcttat ggatttaaaa 92160  
aaattcttcc tcattgaatg tattttcttg ttctacttc gttctccatc tttactcatt 92220  
ctttctttt acctttttct cttgaagaat gaaagccttg gccaaaggcac ttttacaag 92280  
atttttaaag gcgtacgaag agaagtagga gactacggtc aactgcatga aacagaagtt 92340  
cttttaaaag ttctggataa agcacacaga aactattcag aggtgtgtat gttctttata 92400  
ttgttcatgt agtttatgct gtttaaagat gtgctctcat atgcatacaa cgtactcatg 92460  
tgtgcagctt ttcaaaattg taatttttaa atgtgtcaag gacttttctg aggatacatt 92520  
cttgtggggc tatagaatta cagggtttga aaattaccgg attaaaaaaa ttaattccaa 92580  
actaattatg tttagcatta tgttaggagt gttattacat ttctgcata actgtggcct 92640  
tgattttcaa acttggtccc ccagagcttt atgggttaca cagaggctcc tctacaatta 92700  
catttatttg aaaaaaaaa aaaaaaccaa gtttcaaagg cactgtacta aggaacatgc 92760  
ttagtgaaat ctagatgctt ctgggcatca tccagagatg ctagctggca gaccccgagg 92820  
ccagttgcca gagctctgaa catagcaaga tatgatactt acaatatctt aaaggggtgt 92880  
gggttagtaa gatgatgtga aaagttcaag ccaaagagtt gttctaatac agaataccac 92940  
agtattgggtg attgtgattc actaatcata cccaggggtt ctagtcacag tttagttgaa 93000  
ttagagtgat gttaaaacta tgctagtatc ctgacacaga tgtcgtgata ttttatctgc 93060  
acattcttaa ttctttagca agtgttattt aaaggctaca tccatctacc tcagtttctt 93120  
atatctatct ctgacatcta cctctagttg taacttctgtc ctctatttca ggtgttatgg 93180  
gtcaagcctg tttgactggc attattcatg attcctgtac cactcttget ctctctcaet 93240

ES 2 535 178 T3

ttgatctcca tattccaggc ttacacaggg gtttctcag aacgttgatg gcagttgcag 93300  
 gtccatataa agggaccaa gcacattgta tcctcatcta tagtcatgct gaaagtagga 93360  
 gaaagtgcac ctttattatg gcagagagaa ttttctgaac tatttatgga caacagtcaa 93420  
 acaacaattc tttgtacttt ttttttctct tagtctttct ttgaagcagc aagtatgatg 93480  
 agcaagcttt ctcaacagca tttggtttta aattatggag tatgtgtctg tggagacgag 93540  
 agtaagtaaa actacaggct ttctaagcc tttctcagag catctgtttt tgtttatata 93600  
 gaaaaattcag tttcaggatc acagctaggt gtcagtgtaa actataattt aacaggagtt 93660  
 aagtatTTTT gaaactgaaa aactgtagg actattcagt tatactctgt gaaaaaggaa 93720  
 agcaatgaag ttaaaagtag aaggttacaa tgcccaaaca atagagtatt atagtaaaca 93780  
 aatgtctata aaacattttg tgttcatgat agcaaaagag attatggcag gttcaacata 93840  
 acattggaat aactggcctt ttcagtacaa acttatctgg aattatgaag acaaagcata 93900  
 taaatgatac acttaatttt taatggaact gacagaaatg attatgttga tatgatacta 93960  
 gatataTTTT ttggctaaat ttaggtgttc acagaaacta ctaaaagtat aaatcgtacc 94020  
 ccatgcttta atactataca ggcattgcctc attttattgc accttgcttt attgtgcttc 94080  
 ttagatattg tttttttac atattgaagg ttacggcaa cccagtgctc agcaactctg 94140  
 tcagcaacat tttccaaca gcattgtctc atttcatgct tctgtgtcat attttggtaa 94200  
 ttctagcaac atttcaaact ttaaaaaaat catatggtga tctgtgatca gtaatcttta 94260  
 atgctagtat tgtaattatt ctgggggtgc ccaaacagag agaataaag aaggcaaact 94320  
 tcatagatga atgcagtggtg tgctctgact gctccatcaa tgagccattc ctctgtctct 94380  
 ctccctctcc tggggcctcc ctattcctg agacaacaat attaaaatta ggccatttaa 94440  
 taatcacaca atggtcttta aatgttcaag tgaaaggaag attcacctgt ctctcacttt 94500  
 aatggaaaag ctagaaatga agcagcaaac gctgatgtgg aagctgcagc agttatccag 94560  
 aagatctagc aaagaccatt gatgaagatg gcttagagag gaaggcatgc tgaaagccaa 94620  
 gacaagctga aagctaggcc tcttgacta aaaaggcaag ttatgaatcc aaaggaaaag 94680  
 tccttgaagg aaactgaaag tgctactcct gtgagcacat aaattacaag aaagtgaac 94740  
 agtcttattg atgatacaga gaaagttcta gatagaagat caaacagtc acaacattcc 94800  
 cttgagccaa agcccaatct agagcaagat cttaatgctc ttaaattcta tgaaggctga 94860  
 gagaggtagg gaagctgcag aagaaaagtt ggaagctagc agaggttggt tcatgagggt 94920  
 taagaaaaga agccatgtgc acagcataag tgcaaggatga agcagcaaat gctgatgtgg 94980  
 aagctacagc aagttatcca gaagatctag caaggacat tgatgaagat ggtgacacta 95040  
 acaaacagat tttcaaatgt aaacaaaaca gccttctgtt ggaagaatat gccatctagg 95100  
 acttccacag ctagagagga gaagtcagtg cttgccttca aagcttcgaa ggacaggctg 95160  
 accctcttgc taagggccaa tgccattggt gatttgaat tcaaaccagc gctcatttac 95220

ES 2 535 178 T3

cattcaaaa atcccagggc tctgcgaatt atgctaagtc tactctgcct gtgetctata 95280  
catggaacaa gaaagcctag atgacagcac atctgtttat agcatggttt attgactatt 95340  
ttaagcccat tgttgagacc tgctcagaaa aaaagattgc tttcaaagta ttactgatca 95400  
ttgacaatgc acctggtcac ccaagagctc tgatggagat gtacaaggat attcatgtta 95460  
ttttcaggcc tgggtgacaca acatccattc tgtagcccat ggatcaagga gttatttcaa 95520  
ctttcaagtc ttattatcta agaaatacat tttgtaaggc taagctgcca tagatagtga 95580  
ttcctctgggt ggatctgggt aaagtaaagta gaaaaactta tggaaaggat tcaccattct 95640  
agatgccagg aatagcattc atggttcatg gaaggagatc aaaatggcag cattaatagg 95700  
aatttgaaa aagttcattc taaccctcct ggatgacttt gagggatag gtactttaat 95760  
gaaggaagtc actgcagaga tggtggaac agagaactaa gaagtggagc ttgaagatgt 95820  
gactcaattg ctacaatctc acgataagcc ctgaaagaag gaggagttgc ttcttatgga 95880  
taagcagaga aagtgtttc ttaagatgga atctactcct agtgatgatg ctgtgaacat 95940  
tgtgaaatga caacaaaggg tttggaattt tacataaact tgattgatca agcagttgca 96000  
gggtttgaga ggactgacct tgtaaagttc tactgtgggt agaaggctat caaacagcat 96060  
tgcattgctac agagaaatct ttcattgaaag gaagagtctg cagtgaattt cattgtttgc 96120  
ttattttaag aaactgccac agctacctga actttaagca gccaccacca tgatcagtca 96180  
gcagcgatta acatcaagca aaaagattac aactttctga aggctcagat tatcattagc 96240  
accttttttg gcaataaagt atttttaaaa agatatattc tttgtttttt ttaagatata 96300  
acgctgttgc aactaaata gactccatta tagtgtatat acaagtttta tatgcattgg 96360  
gataccaaga aattcatgac ttgctttatt atggtagtct aaaaccaaac tggtaatatc 96420  
ttcagaggtat gcctttattt tagtgcctca caaagtttac attcaagaaa attgtttata 96480  
taattcccta ttttccacta gtaatgcaga ttaaatacac atctacactt gtatgacatt 96540  
ttttcatatc tttgaaaatt gataatcttc tcaaagcag tggtttgaa cctgttatat 96600  
ggaggtatct gagaggctcc tgtggacat gaaggaatcc aggattgttt ttggaagcca 96660  
acacttgttt ttctggcaaa atatgtttta tatatttttt taaaaaagt ttaaagataa 96720  
agcagcgcaa aacatttctg tattttttgc agaattaaaa gattaaatgg agctagaact 96780  
caaattctcc tttatgtcta tagtactata gacaattgtt agtaattttt gtgtgtagaa 96840  
gaacttcagg aaggtttgaa tgtctaaaaa gttatgtgga agagaaatg agaaattttc 96900  
atattttttt aaaaaccagc cataattcag tactaatata taaaggtgtg ctggtatatt 96960  
atatattata catttatgtt atatataata atatataatt gtttagactc ctactcttgc 97020  
tgttgtaagt aaactaaaa ccaaaaatat aatgctgtgt atccattaag ttttctttaa 97080  
agttgtgagt tttgccaatt taatttcttt acctataatg gtcacatgta agtataaaga 97140

ES 2 535 178 T3

tttaaattac atatatttaa ttatatttat acttaagcct tattattatt acttatattt 97200  
 taatgcagat attctgggtc aggagtttgt aaaatttga tcaactagata catatctgaa 97260  
 aaagaataaa aattgtataa atatattatg gaaacttgaa gttgctaaac agttggcatg 97320  
 ggccatgcat tttctagtaa gtagtacaac ctttttatca aaagatacta ttttatttta 97380  
 taaaacaata tacaattat ctttacctgg aaacaaaaa taaactctgta attggatgcc 97440  
 aattcatgta aaatagtctg tgttaggtga taaaagaga ttactttagg catatgttta 97500  
 tgtatgtaaa atcacttttg aaaaaaagt tttgtcatcc catcaatata ttagaactac 97560  
 taatagacaa tctgtatggt gtgtcttttg gatttagaaa attcaaccaa aaattatgca 97620  
 gaagtatgtg cttctgtatt tttgggcat tgtacattat ggtccatgag aaagcgggtg 97680  
 tgacagagaa gaataccagg gggactgcca gtcacagac ccctcagggt gcacctatgt 97740  
 cctgctgcag aactgaagta gtatttctta atgtcagctc ccatccagaa acacaaacca 97800  
 tgtcagcctt agaactcatg tgaatggca ttggtagttt taatttattc atttcatcac 97860  
 aagcatagat tattgtgta tttaaaatgt aaaacaggaa gcataggagt cataaatttc 97920  
 cttttttctc aatgcatgcc tccaaattat tatactatca tgtatttttc ttctttaaat 97980  
 ctgttttggg ggcttgaaca tactaaatgc tccagtactt gtggactgat atttgaatat 98040  
 atgtgcggtt aactctaata ggaagaaaac acccttattc atgggaatgt atgtgcaaaa 98100  
 aatattctgc ttatcagaga agaagacagg aagacaggaa atcctccttt catcaaactt 98160  
 agtgatcctg gcattagat tacagttttg ccaaaggaca gtaagttcta gaaggattat 98220  
 atataatggt actaagcttt acttgggcag tgggtgtaaag ggcattgtgt taattttcct 98280  
 tgaattccat ttaatttga tgttctgat taataataaa attatcactt ttagcaattt 98340  
 aaattgttag ttaaatctta gtctctattt ttctttctta taagcatata accatggact 98400  
 gtgaggtgat tttttaaaa cagttttaat ctctaattat gtatgaagga taggatttta 98460  
 tccattttta gtatgaagtt ttgtaatatt ccttgagcca caagtaaatt ttctaataat 98520  
 tcttttcttc tcgtcactaa ataaaaattt agcctgagat tttaggattt ttttctatcc 98580  
 tctgtgaaga aattagtta attatccagc taattctgac tttttaaaac cttaaaaaaa 98640  
 ctttgatttg tgtttgttca tctttactac ttaacacagt gggttaaaaa tacaatttc 98700  
 agtcagatag ttgagagggg ttttttgggt ctagataatt ataactgaat tttgttatct 98760  
 tagataattt ctctaattgg atgttctaaa tttagattct aaattgatca atttttgtgc 98820  
 actgatgtgt cctatttaag ctaatagtac ttaaacttaa tgacttatct gacagtgaag 98880  
 acagtataa ctgggcagta gtacaggagt agggagtatg gcagaaaatt cttacaggggt 98940  
 cttacatctg gtatcctgga aaattttatc ctttggaatc ggaagtgaag atggaaaaaa 99000  
 atgtattcat atggtgaagg tatttgcata tcaatctatt tgtctgtctg tctatgtcag 99060  
 aataccagaa agtagggta tattgcttct tcctttcttg aatacagtc tctctgtgga 99120

ES 2 535 178 T3

atcaaagacc acagaaactt tacttgagaa attccgtgat ttgagcagag cccacctata 99180  
tcaattccat atatctagaa tattttggg caatttagcc ttccatctgc cataaatgct 99240  
tgttggtcct tgggtttttt tttttatctg caagtgggaa ttgccatggc tattaaatca 99300  
ttagaacatc tctgaatgat gtaacattac ctttactact tacgcattat gaagaaatac 99360  
caaaaagtat catggggcaa ttttaggata aactatataa aaaaaaaga tttggccagg 99420  
tgcagtggtc catgcctgta attccaatgc tttgggaggc tgattgcttc ctaaagcgtc 99480  
tgggtggatc acttaagccc aagaggcaaa agcatagtga gctgcaatcg tgccattgca 99540  
ctctagcctg agtgacacag tgacaccctg tctcaaaaaa aaaatTTTTT ttttttgaag 99600  
gtaaaaactaa tggaaagagg ttgagaaaat ggatgccag ttgagacact atggtttaat 99660  
ggaaaagatta gttgattcag aactcactgt acaggattct aattctgtct ctgctgctaa 99720  
caaattgtgt ggctttgggc agattactca atcatatgtc tccatgttgt cattgttaa 99780  
gatgaaatat tgaattagat gatccttgaag gtcccttctg gttcttaagc ttatgcagtc 99840  
atgtgcatgt gcacatccaa cccctccaaa ataaagaaaa taggcctgat tattcaaatg 99900  
atltgaaactt taaagctatt tacatataaa agattggttt acttgtgaat tatttaacc 99960  
tactctgttc gtatcattta aaagttcttc aggagagaaat accatgggta ccacctgaat 100020  
gcattgaaaa tcctaaaaat ttaaatttgg caacagacaa atggagtttt ggtaccactt 100080  
tgtgggaaat ctgcagtgga ggagataaac ctctaagtgc tctggattct caaagagtaa 100140  
gtttatatag actaagttag aattactcta tctctgaact ttcataattc tttcacatga 100200  
tttgtatltt ttagcccatc taattttaaa aagaaggttg gtgtggcatt acacaattta 100260  
ttctcagttt gtgggtcttt aattatagaa gctacaattt tatgaagata ggcacagct 100320  
tcctgcacca aagtgggcag aattagcaaa ccttataaat aattgtatgg attatgaacc 100380  
agatttcagg ccttctttca gagccatcat acgagatctt aacagtttgt ttactccagg 100440  
tatgtatltt aatgatctta ttgattttcc agctttctat ctttattgta tttaatgaat 100500  
cattactaat ttttaattcc tttaaaacat tttcttgatg tcatttgggc cctcttaatt 100560  
tcttatgttc atatggcttt tcatgcttta tacatattct aatctccttg actgagaatt 100620  
atlttcattt ttataaaaag accttttctt tttttttttt tttttttttg agatggagtc 100680  
ttactctgtc gccaggtg gagtgacgtg gcgcatctc ggctcactgc aagctccacc 100740  
tccaaggttc acgccattct cctgcctcag cctcctgagt agctgggact acaggcgccc 100800  
gccaccacac cgggctaatt ttttgtatlt ttagtagaga cggggtttca ccgtgttagc 100860  
caggatggtc tcgatctcct gatccttgtga tccgcccgcc tcggcctccc aaagtgtctg 100920  
gattacaggc ttgagccacc gctcccagcc aaaaagacct tttctttcag taacctaat 100980  
ttagttttcc atttagtgag ttgtaaatta tagtattttt tttttgctta aattgacttt 101040

ES 2 535 178 T3

taaaaaaciaa ttctctttaa catttctcat attttataat tgattgattc tctaaacatg 101100  
 agctgtatth gttttgcttt gttctctcct ttttcaaaat actgagctga aatgcatgtg 101160  
 tttgacctat aggtgctttc taccacagta ctactcacct ttctcacaat aagtatcagt 101220  
 atattacctt actttatgaa tactaaaact tcttattttg gaaaacaaaa ttttatcctt 101280  
 tgcaaagtct ctcttgaagg cctgtcagat tatgggtaat gattaaaggc tcccattaat 101340  
 ataattgaaa ctatttgagt ttccctgtat catttagtat ttttaactca cgattattht 101400  
 ggtcaacttg aatgtataat agtttagtcc agagaatgth atttgctaat ttaagggtat 101460  
 aatattctth atttctccag attatgaact attaacagaa aatgacatgt taccaaatat 101520  
 gaggataggt gccctggggt tttctggtgc ctttgaagac cgggatccta cacagtttga 101580  
 agagagacat ttgaaatttc tacagcaact tggcaaggta aattgtcaga atthtttcaa 101640  
 atagagtata atcatttcat ttaggaaaaa cttagagcg tttctaaagt tcactttcta 101700  
 caacatttha aggagtgtt gttagaaaaa aaggthtgggt tgtcagatgt tggagaaatg 101760  
 ctgtgttaaa taaacagcta tctttactga atgaaggggg ccagcccctc cacacctgtg 101820  
 ggtaatctc gtcagggtgg accagagact gagaaaagaa agaagacaca gagacaaaag 101880  
 tatagagaaa gaaaagtggg cccaggggac cagtgtcag catatggagg acccgacca 101940  
 aactgtgtct ctgagthtcc tcagtattta ttactgttht cactatctca gcaagaggaa 102000  
 tgcggcagga gagcagggtg atagtgggga gaaggtcagc aagaaaacat gtgaggaaag 102060  
 gaatctgtgt cacaaataag ttcaagggaa ggtactatgc ctggatgtgc acataggcca 102120  
 gatttatgtct tctctccacc caaacatctc agtggagtaa agaataataa agcagcattg 102180  
 ctgccaacat gtctgcctc ccgccacagg gcagthtttc tctatctca gaaatgaaca 102240  
 aatgtataat tgggtthtacc accgaggcat tcagthtcca ggggcaggca ggagacagtg 102300  
 gccttctct tttactaatc ctccccagca cagaccttc acggatgttg ggctggggga 102360  
 cggtcaggtc tttcccatcc cagcaggcca tathtcagac tatcacatgg ggagaaacct 102420  
 tggacattac ccggtthtcc agggcagagg tccctgcggc tttccgcagt gcattgtgtc 102480  
 cctgthtacc tgagactgga gaatggcagat gactthtacc aagcactctg cctgtacaca 102540  
 tthtgtaac aaggcacatc ctacacagcc ctagccttaa accttgattc catacaacac 102600  
 atathttgt gagcttcagg ttggggcaaa gttacagatt aacagcatct cagggcaaaag 102660  
 caattgttca ggttacagat caaaatggaa tttcttatgt cttcctthtc tacatagaca 102720  
 cagtaacaca ctgatctctc tttctthtcc ctataactga agaactthtc agaggcttha 102780  
 acatgtaatg tgcataaaca tcttcaagag gaagatgaat taggcagtat tattcaaat 102840  
 gacttgacca agagactgtt ccttggtagc aggagthcat tgthtaagtga ttcagtgaaa 102900  
 tacagaaagg aatacataag cthttctgcc tgcctthctg cctthtagtha tctcaggag 102960  
 aattaatctt attgcttagg gtctaggatt ttgactgtgc catattcact agcagagact 103020

ES 2 535 178 T3

ctgtctatta aaacgtcaca cagtcatgta taacctacat attataagta agaccagggga 103080  
 atgctcagtt cttagtaggt ccaaccatag tggtaaagctc tttctcgcac aagcttgcta 103140  
 ggataagggt ctcactagta agtaccatgt tagtggttgc tgttattatc agctattcct 103200  
 aaattcatat tttcctgaaa tatctccaga tgtcattgat tttcctcttt tctgggaact 103260  
 tatagcattt attgtttctt ttatacaact taatcacagt cttctgttgt ttattagatc 103320  
 ttggtttttg tttgcttgcc ctttttttcc ttgacttaaa aaaagttcct ttagatccca 103380  
 atagattact aggcacacaa ttttgtcata tattgtcaaa acaatggaat atatactggg 103440  
 atttaagaag tagacataac aaagaataca tcaaaagatc actaatttag attaacaaaa 103500  
 gggaaacagc agactaaatt ataaagttat cttttcaagt aatttttcta gttatgaaag 103560  
 tgataactg cttatagaga aattggaaaa tattacaatg aagatacgtt ccatttggtg 103620  
 tagtctctgc acaactacac aatttctttc aatagtgaaa ccattctata tatacaattc 103680  
 tatactctgc tatttttcat atatcaagat tttcccatta ttaatattct tttgagacat 103740  
 aattttaagt gaatatacca taatttattt acaacattcc cctttattgt aattttgagt 103800  
 taatgttctt ttgcttttta acatttttag tgttttccat agttccgtga gcttaaaatt 103860  
 cttttaaaca taagtaaatt gaagagactc taaggaaggc gttttcaaaa tacatgtaca 103920  
 atgaaatata tttcttagta atttagttg taggaaatga aaggtaaagtg gtgtaatcat 103980  
 tagtcagtca tagatatttt aatgtggata tttcctatct gtatttaaca ccataatttt 104040  
 actttcatct ttgtttgtt gaagtaattg atgtgttctg tggtttctct agatatttgt 104100  
 actgccttac tgaaacaatc aaaatgcat tcctacaaaa atgattgcat gtcaccttc 104160  
 cattttataa aaattagcta ctgtatccct ttgttatcct tttcaattag tggtaggtg 104220  
 aaaatattcc aaagagggat atatattta aattattttc atatgtttta agccaagaga 104280  
 aataatggta tattttttta ttttttaaaa aatattttca tactgttgta aaaggagcca 104340  
 agaaactatt gtgaaatcct ttcttttgcct atttgaaatc tagagtgttt tttgctttct 104400  
 tcctttatcc tcatgcccac atatacttat attctttttt aaattaattt taacatggat 104460  
 tatttggtga atagccttac atgtggatat taacagtgta aacagtacca catataacca 104520  
 tcaagacacc tcaattagaa tttataggac tagaatgaca gattcagatg gtttaattac 104580  
 atttaaaaag ttttctgaaa aaacttttgc aataaaaaca attgcccac aataagttg 104640  
 atatctttta aatgatattt tggttatctg cacatgaagc aaacaaagtg tattccacaa 104700  
 aattcttagg cacagtctga gatagctgcc agaaagaaca gaaagagttg tcatttatgt 104760  
 cttgtgagta caatttctga aagttgaatg agggcgtctc tttctgggga tgagaagttt 104820  
 actgctctct cttattgctt catggcagta ctgctgggca aggtagggtg tttgttttac 104880  
 accatcactc tgtaatacat actgtggagc tctgtctaca tctcccggca aactgaacca 104940

ES 2 535 178 T3

tctcatgac atagcattca tttctgggaa ctgctgacag gcaaatagga caggaccagt 105000  
 ggctaacctg agattcacat cagctgatgt tggtttgccct atgttagaac atgaggtgaa 105060  
 gtcgaataca tcatctatta gctgaaaagc taticctaca ttttttccgt actgataggt 105120  
 gatctcatgc accactgggt cggggcatcc tagaacagag actgctttac aactggtggc 105180  
 taticaggctc gcagttattct tgaaggtctt ttcaaggat tgtgcaaatc tctcatgctc 105240  
 attttctttt gacccgagct gaagaaattc accacacacc aaatcttcaa taactcgggt 105300  
 taaaaatagat ataacagctg tatttccagt ttgtgcccc cctatagata ctacagaaag 105360  
 aattaaatct ccagcaagga cagccttctt ttcaccccag atcttgtgtg ttttctttt 105420  
 cgagaactg cattatcaat aacgtcatcg tgaacaagac tagcagtgtg gatcatttct 105480  
 gcaattaagg ctgtggcgcg ctggctagct tgcacatgct gggagttatt atgatgaata 105540  
 ttacatgctc gggccattag taccacaata attgatcgaa aggcctttcc ttttacctca 105600  
 aagtagtact cagagatttc cttaagttct gttgttgata tgagcgggtc ctttctaata 105660  
 ccctcataca gacctttcaa gtctctcaa ccgagtttg aaggatcgggt gtatttctca 105720  
 ccaactgtgtg ttttctgtg cggggttgtg tgatgaaact gtgatatact atatacattt 105780  
 ggacaggcag gtgttaaatg cttcacaaga ttaaaatagg gtatctgaga caagtcaagt 105840  
 cccttctgcc tatgagcctg cgcgggcatc ggcagcggcg cgcggccccc ggggccccgc 105900  
 aaggctcggg gagcgggtc cagcgcgccc gtctccagca acagccgcgc cgcccccgcc 105960  
 accagcgcga ggcacggtc ggagtctgaa agtcgcggta ggatggtggc tccgcctctg 106020  
 gcccgcgac ctctgccag gacctggagc ctgaaacctc ttatattctt tatatccttt 106080  
 accttctcgc ttcactccta gcggttttga aatcctctt attcctttt cctccatggt 106140  
 gcagatatgg gattcagaga tcaggatctt agtgcgacta ctttgaaatt atcagcatca 106200  
 ttctcaatct tctctgaata tgattcttat tttcctctct tccatcatt agctaacatc 106260  
 ttggtccaca ttccttgaat acttttagta ctcatgttt tctcatcacc ttacctctg 106320  
 ccattatttt ggatgccctt ccaatactta aaaaaaaaaa tccttggtt ctctacccca 106380  
 aagttatgat tatgttaaat gagttccttt gaactctata atccatgta ataacttac 106440  
 ttagaaaatt tcctaccctg aaatctccct gtctgactat aactttatag cctttggctt 106500  
 ttttcaacat aaatgccttc tttttgatat ctttggatt gctagtgtct ttcacacttt 106560  
 cttcttattg gaacgtaaat tggtgaccct ttctagagag cttctcatag agcagtttgt 106620  
 atcaagcgcg ttaaatgtt catatctttt aaactacttt cgctggtatc cacaattata 106680  
 tcaccccccc ttccttgat tatctgcttc actttcccta ttatttcta gtacgggaaac 106740  
 aatacaactt agcattttta aattgtgctt ccatccctca aacactaaaa gaaaaaaatc 106800  
 agatataaat ctttattgtt ttcattgaaa attggtttcc aacattggtt aggcacttat 106860  
 gactcttact ggttgattta gtctgttctc acgctgcaaa taaagacata cccgagactg 106920

ES 2 535 178 T3

ggtaatttat aaaggaaga ggtttaattg actgacagtt acccatgget ggggaggcct 106980  
 caggaaactt acagtcatgg cagaaggcac ctcttcacag ggcagcagga gagagaatga 107040  
 gtgccagcag gagaaatgcc agatgcttac aaaaccatca gatctcatga gaactatcac 107100  
 gagaacagca tggaggaaac caccgcgatg attcagttgc ctcccaccag gtccttccaa 107160  
 tgacatgtgg ggattatggg gtttacaatt caagatgaga tttgggtgag gacaatgcca 107220  
 aaccatatca ctcccttact tgatttcttt cctggtceta tctcaaacce ttctggtttt 107280  
 ctatcttaaa tctttctttt cgctgtatth ttcttcctct ccttcttcca taagaaaaat 107340  
 agaggcattc cgaattaaaa gtgagactga tttttgccta tcaaagtgac aaggatttag 107400  
 aaaaagtata atgatcattg ttggcagggg tgtgataaaa tatacatttt cccactgctt 107460  
 attggaacat caaatggtaa ccaactgccag acagctteta atgcagtgtg tatcaagtcc 107520  
 ctttgaatg ttcttatctt ttgaacagct aattaagtat ccttaataga gatgtacaca 107580  
 aatatttatt tataagaata ttattgcaat gacatgactg tatttaaaaa tttttcttag 107640  
 tgtacattta tgtttccaat gttaaaatta gtgattcgt gtgacaatat acaataatta 107700  
 aaaattatta atttcaagga atatatagtg gcactagaaa ataaatttta tgaacacatt 107760  
 gttaagtaga ggggaagaag ataaaactta tttcctactt ttgttttcta aaatgtgtht 107820  
 tggataaatt tctcacaaca gcctcatgag atagacattt tattattctc cactttaagg 107880  
 atgaaaaacc tcattttagg gagttctgaa ttgtccgcgg tcacagagag agcaagttgt 107940  
 ggatcaatat tctagttcca atctgacttg agagtcctgg gtcttgagag tcttgggtct 108000  
 atccacctta ttgtgtggcc ttctaaactg tgtaattaag agatttaact ttgagcctac 108060  
 atggtctagg ttttttaaaa aactgacttc aagtatataa ctgaaaatat agtcaacttag 108120  
 aatcttgha ctcaagaact acattgtttt atctgtgaa atgcaataa tatccaaaat 108180  
 acactaattt gattaatctc aaaaacctat actttattta aatgthtag caacttacca 108240  
 attctatgta cttaatgagt tttaggtaaa aagagtggat ttctttaaag acatcttcaa 108300  
 aaaaaaaaaat gtagagtcac cccataggct aaaagtttct tacttcttaa tttgctttgg 108360  
 ctgctataac aaaataccat agactgggta gcttaaacad cagacattta tttctttgaa 108420  
 ttccagggcc tggaaagtct gagatcaaag ttctggcagg gattggtht tagtgaggth 108480  
 tcttcttggc ttgcagatgg ccactctctt gctgtgtcct cacatgggag agagagattg 108540  
 ctctaagtct tcttctctt ataaggcac tagccttgtc acattagagt tccacctta 108600  
 taacctaat taacttttat cacctctca caaggcccta tctccaaata cagtcattat 108660  
 gggggttaag gcttcattat ataaattttg ggtaaggggt cactgacatt tagcccataa 108720  
 cagacacatt ccatccagat cactgacagt gatagcaaaa ggtattttgt aaaaaaggaa 108780  
 aattcttctt ggaagttagt gacaaaagt taggaatcct cagcatgtcc cttggcttat 108840

ES 2 535 178 T3

ctgacaatt aatgctcatc atttatttaa atgctttttt gaagtaattt atatttcagc 108900  
 ctataattcc ttttgaagaa attaaattta cagatttact acccacctgt tgagatagta 108960  
 tttccttttc ttgttctaag agttccttaa tataagctta aagatagtct gctgctgggc 109020  
 atggtggctc atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gagttgggtg gatcaccagg 109080  
 tcaggagatc aagacaatcc tggctaacac agcgaaaccc tgtctctact aaatatacaa 109140  
 aaaattagct gggcgtattg gcgggcgcct gtattcccag ctactgggga ggctgaggca 109200  
 ggagaatggt gtgaaccacg ggggcggagc ttgcagtgag ccgagatcgt gccactgcac 109260  
 tccaacctgg gtgacagagc gagacttcgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 109320  
 agacagtctg ctaattccag ctactagaat tttctatata attataaaat ttatttgtaa 109380  
 tttgccttga aaacttggtt tttccatcct aatgtgatgt gtcatttagg gtaattttgg 109440  
 gagtgtggag atgtgccggt atgacctct acaggacaac actggggagg tggctcgetgt 109500  
 aaaaaagctt cagcatagta ctgaagagca cctaagagac tttgaaaggg aaattgaaat 109560  
 cctgaaatcc ctacagcatg acaacattgt aaagtacaag ggagtgtgct acagtgctgg 109620  
 taagctgcc attgaaacct attttaaat caaggtatgt gtttggcatc ctgtgtaata 109680  
 taaatgtaca atgtcttaac gatctggact tatgccaatg cccagagggg gaggcattct 109740  
 ataatgacta gagattgtgt ttggtgatca tagactataa ctataggaag tatttggtta 109800  
 gttggttaaa cattcttttc acctcttgcct taagcttacc aagaaagtat catttttaaa 109860  
 ggaattgttt ttgtttacat tttctataaa aatatttttg aattcaatgt tttttgttcg 109920  
 atatcaatga ggagaaagga agttttctca tcagtttatt ttggtttgcc tgaagagtta 109980  
 tagaaaactg aaacgcaaat agtttcaaag cttttattca ttcaaaagtt tttgattcaa 110040  
 aaagactatg ttcttaacaa ctatatcacc tttaatgtat aataaagttt tgtcatctta 110100  
 gatttcatat atgtttaagt catttatgta tgatagtttt ctaatattta atcagtataa 110160  
 tatggcagag taaaacatta tttccacctt tatgttaaaa ggtcggcgta atctaaaatt 110220  
 aattatggaa tatttaccat atggaagttt acgagactat cttcaaaaac ataaagaacg 110280  
 gatagatcac ataaaacttc tgcagtacac atctcagata tgcaaggtaa ctaatatcct 110340  
 gattatttgc thtagatgaa gcaaccgtgt tgaagtagac attaggaat catctagacg 110400  
 ttttcataga taataaaggg aatatatagg gttaagacca tttaaattgt ttatatattat 110460  
 aaaactagct gaaagaaaaa tgttttatcc atagggtatg gagtatcttg gtacaaaaag 110520  
 gtatatccac agggatctgg caacgagaaa tatattggtg gagaacgaga acagagttaa 110580  
 aattggagat tttgggttaa ccaaagtctt gccacaagac aaagaatact ataaagtaaa 110640  
 agaacctggt gaaagtcca tattctgggt agtatatttc agtatgataa atgaaatfff 110700  
 agagcacaga cttcaaactt tattgttgtt atttaatagt ttgccatttc tatatttaca 110760  
 gtaacagtga acatttaagt cttttaagtc ttacatttaa cttttttttt ttaggtctta 110820

ES 2 535 178 T3

tagtcatggg tatagtcac gtgggaaaat ggcatatgct ttatttctat taagtgttgt 110880  
cttatttata gggattgtag gtttttcttc aaaactgtct cctatttatt gaggcttagg 110940  
ggtaattatt agtggtgctg tgggttggg tattgtgtg aattttggtg gggctttcat 111000  
ggggttaata gtctttttta tttacttggg tggataaatg gttatttttg gttatactcc 111060  
agtgatagct attgaggagt atcctgaaac atgagggcca agtactgata tttgaggggc 111120  
cttattatta ggattattaa tagagttgat actggtttgg tgaatagttg aatatgatgg 111180  
gggtgtgac acgggtgatt ttaatagcat agggagttga ttttaatttt gagggggagg 111240  
ggttgattca tgaggatttt gtaggtgcag ctgccttga taattatggg tgttgggttg 111300  
tggttgctgg ttgatcattg ttagtatttt tgtcgcaatt gaaattactc agggtaatag 111360  
attagataat taatagtaga gtttagcct ttttggcag atacagtaat ggaggctgaa 111420  
gtttgggttc gtgaaatggg ttttggata gacttttcta gtcaaactgg gtctagtaga 111480  
agtgaagcta gatthtggct tatgaatagg cttaagtcgg ggggctgaat ggtgaattgt 111540  
agctgaataa aaacctagta tactggagaa gttaaatgtc tataatgggt actttaagg 111600  
tgttagttat gaaattaagc tctattgcta gtaagagacc taggggtggt acacctagg 111660  
ctgtgagctt taggtggagt ggtatagttg tttgggggga tgaagtaggg ataactgt 111720  
tagtgatgag gaatccggcg aagatactgc cgattgctag gtgctgaact gagttaattc 111780  
ggagaggatt atcattaata acaatcagaa ttgtaaaaca aggttgcct attacagcac 111840  
ctaaggttat aaagtaagca caagtaaata cataaaaacg ttaggtcaac gtgtagctca 111900  
tgaggtggca agaaatgggc cacatttctt accccagaaa atctcagcac aacctttatg 111960  
aaatctaagg gctcaaggag gathtagcag taaaccaaga gtagagtgtc tggttgaggt 112020  
tgaataaggc cacgaagcac gcacacactg cctgtcacc tccgcaaata tcattctaga 112080  
aatattattt aaattctcta tacatgaata gaggagataa gtcgtaatat ggtaagtgt 112140  
ctggaaagtg ctcttggaca aacaaagtgt cgcttaacc aaagcatcca gcttacacc 112200  
ggaagatttc atcacaacct ggtcactttg agccaacct agcccaaac ctactaaaa 112260  
atactattaa accatcgtaa tcaaaccatt taccttagac aaaagaatag gcaatagaaa 112320  
ttcttatctt ggcacaatag atacagtacc gtaagggaaa gatgaaagaa ctgagcaaag 112380  
acaagccctt atacctctg cataaagtat taagtagaaa taactttaca cagagatagc 112440  
caagtcccc gaaaccaa at gagctatgca agaattggctg aaagagcgta ctcacctacg 112500  
tggcaaaata gtgggaagat tcatgagtag tggtgataag cctatcaagc ctgctgatag 112560  
ctggtgtcc aagatagaat cttagttcag ctttaaactt acccacagaa ttacttaatg 112620  
tcctgtaag tttactgtt aatctaaaga gggacagctc tttagacct aggaaccaac 112680  
cttctacag agagtacaaa ataacatgc catagttggc ccaaaagcag ccaacaatta 112740

ES 2 535 178 T3

agaaagtgtt caagctcaac atccaagtat cttaaattct aatcactcta cggaactcct 112800  
 aacattacac tggctctaate tattatttaa tagaagcaat aatgттаата тааатаасат 112860  
 gaaaaatattc tccaccgcat aagcttacat aagactggaa таасссасctg actgacagtt 112920  
 aacagctaga таттттаса тааgсатсct attatttata ctgттаатсс аасасaggca 112980  
 tgctctaagg ааататтаса аааagтаааа ggaactcggc ааатсttacc ссасctgttt 113040  
 accaaaaaca tcacctctag cattaccagt attagaggca ctgcctgccc agtgacatat 113100  
 gttcaacgac caccatatcc tgacctgca aaggtaacat aatcacttgt тссctaaata 113160  
 gggacttaga агаатggcca catgagggtt сagctgtcat gagggttcag ctgtctctta 113220  
 cgtttaatca gtagaatctg acctattggt gaagaggagc ttataagcaa атааgатgag 113280  
 aagaccccat ggcactttaa тtcattaatg сааатааааа сtсaaаааgс ctataggcct 113340  
 таассtасta tctctgcatt ааааатттg gttggggтga сctcatagca таттсаасct 113400  
 ccgaacaacc тааасtaаga ссасagtagt сtaagcгagт таатасасат tgaccaata 113460  
 attgatcaa сagaacaagt тассctaggg атаасagтgс аатсctattc татсататса 113520  
 атаатagggt ttacgacctc gatgttgat сaggacatcc таатggтgта gссgctatta 113580  
 aggttcatt таттсаатga ттааagтсct atgtgatctg атттсagacc агagтаатсс 113640  
 aggttggttt сtatctgttt аасатттсtс сtagtatgaa агgасаagag ааатасggcc 113700  
 сacttcataa агtgссctcc ссccataaat gatgctatct сaatctagga аатсассаса 113760  
 сасссаagaa сagggtttct тааgатggcg gagcctggca atagcataaa сgтаааасt 113820  
 ttacaatcaa агgttcaact сссcttctta асаататgсс татааттаас сttttсctac 113880  
 ttatattccc actctaattg сtatagcatt сcttacactt аасagттасg сaaaggасct 113940  
 gataccgtag gсссctgtgg actgcttcaa ссatttгctg асссаатааа acttttсacc 114000  
 агagаассct тасgассctc аасgtctact gttacccttt ататсаттgс сtсcaассct 114060  
 ggcсctttct атсассctcc тcttctggac тсссcttсct атассссатс ссctaattaa 114120  
 тttтаатата ggcctcttat тtattctagc сасатсаagс сtagcagtct аттсаттct 114180  
 атgатсagga тааgсатсса аттсааатта tgtactgatc ggcасасctac gagctgtggc 114240  
 ссagacaatt тсататgaag тсассctagc саттатсctg сtatсасctac тactgctaag 114300  
 тggctcaact тататgсatg сатсасаатg ссagaattac тctgассgct сctассатса 114360  
 тgасссcttag ссататтатg атттатттсc асасctagcaa ааасctaaссg агсссctttt 114420  
 gacttaacag аааgаgаатс агаасctagtt тсaggcttca атgtсgaata тgctgcaagt 114480  
 тсатттgссс тcttctttat агсagaатат атgaататта ttgtataaat gссctgacta 114540  
 сtасctатттt тctaggagta сtасасасcta тgtattсacc агaaсctctgt ассатааатт 114600  
 тсаттассаа gассctсctt ттаассассg тttttatgaa тссgaасagс атасctссаа 114660  
 тtсасctаса ассaaсctсат атасctttta тgaaaaaатт тсctассасct тасатtagca 114720

ES 2 535 178 T3

ttctgcatat atctcaatgc ctttcctaat ttccagcatt ccaccccaaa cataggaaat 114780  
 atgtctgaca aaagaattac tttgatagag taacaagag aggttaaaat cctcttattt 114840  
 ctggaactat aggaattgaa cctatccctg agactccaaa attctccatg ctacctatta 114900  
 aaccatatcc taaagtaagt tcagctaaat aagctattgg gccattctc ctgaaaatgt 114960  
 tggttatacc cttcccatc taattaatcc attagctcaa cttattatct ctcttactat 115020  
 tttcacagga accctcatca caatgctacg ctcacactga tttcttatct gaacaggcct 115080  
 aggaataaat atagtagttc ttaccccat cttgattaaa aaaacaaatc tccactctac 115140  
 agaagcagcc accaaatatt ttcttacaca agcaactgca tctataatc tcatgatggg 115200  
 tatccttttc aacaaccctg cctccgggca atggacaata ataaacta ctaatacaat 115260  
 ttcacctta ataataacag ccctagtaat aaagctagaa atagcccct ttcacttccg 115320  
 agtcccagaa gtaaccagg gaacttctc aatgtctggc atacttctcc tcacatgaca 115380  
 aaaactagcc cctatctcaa ttatatttca aattttcca tcaataaaca cgaccagtct 115440  
 cctatctatc acaatcctat ccattaacgt aagcgggtga ggaggactta atcaaacaca 115500  
 attctgcaaa atcttaacct actcctcaat tactcatata ggttgaatga tcccagtact 115560  
 aacttataat ccaaactgta ccattataaa tctgattgtt taccttattt taacaactac 115620  
 cacatttcta gcacttagcc taagtataag cactacaacc ctgtcactgt ctcacacttg 115680  
 aaacaaatta acatgattaa cacctatagt ttcactaatt ctactatccc taggagcttt 115740  
 acctccatta acaggatttc tgctgaatg agtcatcatt caagaatttt caaaaaaca 115800  
 tagtcttatt accccaacca ttatagctat cataaacta ctcaacctgt agttttatat 115860  
 atgcctaatt tactccatct caatgacaat attcccaca tccaataata cgaaaataaa 115920  
 atgacaattc aaaaacaca aaccatatt actcctccct ccacttattt cttctacctt 115980  
 cctcttacc atctctccac tgattctagt tataacttag aaatttaggt taaataagac 116040  
 cagggacctt caaaaccctt agtaaatgaa ttataactaa tttctgtaac aaacccaagg 116100  
 actgcaaac tctattctgc atcagttgaa cgcaaatcaa ccactttaat taagctaagt 116160  
 ccttgctaga tgggtggaat tcaaaccac aaaaatttag ttaacageta aataccctaa 116220  
 tcaactggct tcaatctact tctccctcca tgtgggggga gggtggtagg ccggagaagc 116280  
 cctggcagca ttgaagctgc tcctttgaa ttgcaattca acataaaaaa ttacctcagg 116340  
 gctggtaaaa agaggcttg acctctgtct ttagatttac agtccaatgc ttactcagcc 116400  
 atttaccct ttttccact tatgttcac aattgttgat tgttttcaac caatcacao 116460  
 gctatcggaa cactatacct gctgttcggc gcatgagtgg ggatagtgagg tacctcctta 116520  
 agccttctaa tttgagcaga attaggtcaa ccaggaactc tgctaggaga tgaccagatc 116580  
 tataatgta ttgttaccgc ccacgaattt gtcataatct tctttatggt catatcaat 116640

ES 2 535 178 T3

ataattgggg gtttcggcaa ctaactagtc cctctgataa ttgctgcccc tgatatggca 116700  
 tttccacgga taaataataa tgagcttttt acttctcccc cactctttcc tactcctact 116760  
 tgcacacctca atagaagccg gtgctggaac tggetgaaca gtttatcccc cttagctga 116820  
 aaacctaaca catgcaggat cctttgtggg tcttaccatc ttctcacttc acttggcagg 116880  
 tattctattt taggagccat taactttatt actacaatta ttaacaaaaa gccccagcc 116940  
 atatcccaat atcaaacacc ccttttcgtc caaccattcc tcattacagc aatcctactc 117000  
 ctttctctct cagtcctagc cgctggcatt accacaatat taactgaccg taacctcaac 117060  
 actacttttt gaccctgctg gtgggggtga tcctatctta tatcaacatt tattctgatt 117120  
 ctttggctac cctgaagttt atatccttat tctatcaggc tttgggatga tctcccatgt 117180  
 cgtgacgtat tactctggaa aaaaggagcc atttgggtat atgggcatag tatgagccat 117240  
 aatatctatt ggcttcttag ggtttattgt atgagcacac catatattta cagtaggaac 117300  
 agacatagac acagacacat gagcatactt cacctccgct accataatta ctgctatgcc 117360  
 tactggcatc aaggcttita gctgattagc tacactgctg ggtggtaaca tcaaatgac 117420  
 tcccgaatg ttctgagccc taggattcat ctttcttttc acagtaggag gtctaattgg 117480  
 cattgtacta gctaattcat cactagatat tattttacat gatacact atgtttagc 117540  
 tcatttccac tacgtcctat caccaggagc ggtgttcgcc atcataggag gctttaccac 117600  
 tggttcccc attctcaggt tatatgctta atcagacctc cgctaaaatt cacttcacca 117660  
 ttatattcat aggtgttaat ttaacctttt tcccacagca cttccttggc ctatccggta 117720  
 tgccgcaacg ttattccgat tctctgatg catacacgcg atgaaatatt atctcatcct 117780  
 taggctcatt tatctcatta gcagcagtta tgctaacaat ttttataatc tgagaagcct 117840  
 ttgtttcgaa aagaaaaact ataacaattg aacaaccatc tagtaattta gagtgaactt 117900  
 atggctgtcc accaccttac cacacattg aagagccaac ctacattaa cccttaaatg 117960  
 aaaaagaaag gaattaactt ccagaaactg gtttcaagcc aatcaaaaac ctctgtgact 118020  
 ttctcgataa gatattagca aattcattac gtaactttgt caaagttaag ttataggcta 118080  
 aatcctatat gtcttaatgg ctcatccagt tcaattaggc cttcaagacg ctacatcccc 118140  
 tatcatagaa gaaccgctca ctttccgtga ccacgttctt ataattattt tccctaattag 118200  
 ttctgtggtc tatacattat ttccgtaata ctcacaacaa aattaactca tattagcacc 118260  
 acagatgccc aagaaattga gactgtttga actatcttac ctgccattat ctttaatttta 118320  
 aggcctctca tcctacgta ttctgtataa aacagatgaa gtttaataatc cttcccttac 118380  
 tgtcaaagca attggctatc aatgatattg aagctatgaa tatatagact atgaagaatt 118440  
 aagcttcaat tccttttttt tttttttgag acagagtctc gctctgtcgc ccaggctgca 118500  
 gtgcagtggg gtgatctcag ctcaactgca gctctgcctc ccgggttcac gccattctcc 118560  
 tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgaccgc caccatgctt gggttaatttt 118620

ES 2 535 178 T3

tttgtatfff tagtagagac ggggtttcac catgtagcc aggatggtct tcatctcctg 118680  
 acgttgtggt ccaccactt cagcctccca aagtgctggg attacaggcg tgtgagccac 118740  
 tgcgccgggc ttaagcttca attcttatat aaccccaaca ccagacttaa aaccaggaga 118800  
 acttcgactc cttgaagttg ataaccgaac aattctccca acagaaatac ccatccatat 118860  
 attaatctca tctgaagaca tcttgcactc atgaactatc cccttattag gcctcaaaac 118920  
 agatgcaatc cccagatgct taaatcaaac taccttaacc actggggcag caggctotta 118980  
 ctatggacag tgctcagaaa tttgtgaatc taaccagttt tatacctatt gtctetagaac 119040  
 taatcctctt aaaatatttc aaaacctgat ccacatctac actaaaatat cactgtaaag 119100  
 ctattcagca tttacctttt aagttaaaga ttgacggagt ctacacctct ctgcagtga 119160  
 tgcctcaact agatacttcc acatgatcca ttattatcct gtcaataatc ataactttat 119220  
 tctccattat tcagttaaaa ttattaaatt tcatttatat tatccctaca ccaaaaataa 119280  
 tcaaaacaca aaaacacaag gcttcctgag aattaaaatg aacgaaatct attcatctct 119340  
 tttgctacc ctaacaattct aggcctacca gcagtagtat taatcattct gtttccact 119400  
 gtttccaacc tctagtcac aaattagtaa ccgattattt tctattcaac gatgattaat 119460  
 ccaacctgca ctaaaacaga taataattac ccataacatt aaaggacaaa cctgatccct 119520  
 tataataata tccttaatta tcttcaactgc ctcaaccaac ctcttgggc ttctaccca 119580  
 ttcatctaca ccaactatcc aattatcaat aaacctgggt atagcaatcc ccctgtgagc 119640  
 aggcgcagta attacagtct tctgctttaa aacgaaaaac tccttggctg gctttttacc 119700  
 acaaggcaca cctatgccac ttatccctat actagtaatc attgaaacca ttagcctatt 119760  
 tattcaacca atagcattag ctgtgcaatt aacagccaac attatagtca gtcatctact 119820  
 aatacattta attgcaggag acacactagt actattagct attagtttcc ccacagcttc 119880  
 agttgctfff attattctaa tctactgac tattctcaa ttcgccatag acctattca 119940  
 ggcttatgtc ttcacactac tagtaagcct ttatctatat gacaacacat aatgaccac 120000  
 caaacacatg cttgccatat agtcaaacc agcccctgac cactaacaga agctctctca 120060  
 gcttactaa taacatctgg cctggccatg tgatttcaact ttaattctac tactctttta 120120  
 accctaggcc tattaatcaa cacactaact gtataccaat gatgatgtga tattatctga 120180  
 gaaagtaaat ttcaaggcca ccatacaaca gttgtccaaa aaggcctcca atatggaata 120240  
 attctattta ttatctgaga agtattcttc tttgctggtt tcttctgggc attctatcac 120300  
 tctagtctag ccccaatgcc agaattagga ggacactgac ccccaacag gcatttttcc 120360  
 cctcaaacgc ttagaagtac ctttctgaat acatctgtat tatttgcac aggagtttca 120420  
 gttacttgg ctcacacag cctgatagaa ggaaatcgaa agcaataat tctagcacta 120480  
 tccatcacga ttaccttagg tatttacttc accctctac aaatctcagt actttgaggc 120540

ES 2 535 178 T3

cccttttact atctctgatg ggatctatgg ctcaacattc tttacagcca caggctttca 120600  
 tggatttcat gttattactg gatcaacatt tctcactatc tgcttcctcc gccaatataa 120660  
 atatcacttt acaagatgtc tgaataggaa tagctccagt ctgcagctcc cagcatgatc 120720  
 gacgcagaag atggtgattt ccgcatttcc aactgaggta cctggttcat ctcatcggga 120780  
 ctggttgac agggggtgca gccacagag ggcaagtga agcagggcgg gccatcacct 120840  
 caccagga gcaaacaggg tcaggggatt tccctttccc agccaaggga agccatgaca 120900  
 gactgtacct ggaaaatcag gacacttttg cccaaatact gtgcttttcc aacagtctta 120960  
 ccaaatggca caccaggaga ttatatcca tgtctggctt ggcaggtccc acaccacgg 121020  
 agccctgctc actgctagca cagcagccta agatccaccc gtgaggcagc agcctggcag 121080  
 gcgagggggc gtccgccatt gctgaggctt gagtaggtaa acaaagtggc caggggaagct 121140  
 cgaactgggt ggagcccacc acagctctgc aaggcctgct gcctttgtag acccacctc 121200  
 tgggggcag gcatagctga aaaggcagca gaaacttctg cagacttaa cgtccctgtc 121260  
 tgacagctct gaagagagca gtgtttctac cagcatggtg tttgagctct gacaatggac 121320  
 agactgcctc aggtggatcc ctgatgcttc tgtagcctaa gtgggagaca cctcccagta 121380  
 gaggccaact gacacctcat acaggtgggt gcctgtctgg gacgaagctt ccagaggaag 121440  
 gatcaggcag caacattggc tgttctgcaa tatttgctgt tctgcagcct ccaactgaga 121500  
 taccgaggca aacagagtct ggagtggacc tccagcaaac tccaagagac ctgcagctga 121560  
 gggacctgac tgttagaaaag aaaactaaca aacagaaagg aatagcatca acatcaacaa 121620  
 aaaggcatc cacacaaaaa ccccatctgt aggttaccag caccaaagac caaaagtaga 121680  
 taaaaaccaca aagatgggga gaaaccagag cagaaaaagct gaaaattcta aaaaccagag 121740  
 ggcctcttct cctccaaaag attgcagctc cttgccagct ggatggagaa tgactttgac 121800  
 gagctgacag aagtaggctt cagaaggttg gtaataacaa acttctccaa gctaaaggag 121860  
 gatgttcaaa cccatcgcaa ggaagctaaa aaccttgaaa aaagattaga ccaatggcta 121920  
 actacaataa acagtgtaga gaagacctta aatgacctga tggagctgaa aacctggca 121980  
 tgagaactac aggacgcatg cacaagcttc actagccgac ttgatcaagt ggaagaaagg 122040  
 gtatcagtga ttgaagatca aattaatgaa ataaagcgag aggagaagtt tagagaaaaa 122100  
 agagtaaaaa gcaacaagat aaagcctaca agaaatacag gactatgtga aaagaccaa 122160  
 tctacatttg attggtgtac ctgaaagtga cggggagaat ggaaccaagc tggaaaacac 122220  
 tcttcaggat attatccagg agaacttccc cgacctacca aggcaggcca acattcaaat 122280  
 tcaggaaata cagagaactc cacaaagata ctctcagaga agagcaaccc caagacacgt 122340  
 aattgtcata ttcaccaagg ttgaaatgaa ggaaaaaaat gttaagggca gccagagaga 122400  
 aatgtcgggt tgcccacaaa gggaaagcca tcagactaac agcggatctc tcagcagaaa 122460  
 ctctacaagc cagaagagag tggaggccaa tattcaacat tcttagagaa aaagactttt 122520

ES 2 535 178 T3

caaccagaa tttcatatcc agccacacta agcttcataa gtgaaggaga aataaaatcc 122580  
 tttacagaca agcaaatgct gagagatfff gtcattacca ggcctgcctt acaagatctc 122640  
 ctgaaggaag cactaaacat ggaaaggaac aaccagtagc agccactgca aaaacatacc 122700  
 aaattgtaaa gaccatcgat gataggaaga aacagcatca actaacgggc aaaataacca 122760  
 gctaacatca taataacagg ttcaaattca cacataacaa tattaacctt aaatgtaaat 122820  
 gggatgaatg cccaattaa aaaacacaaa ctggcaaat ggataaagat tgaagacca 122880  
 tcactgtgct gtattcagga gaccaatctc atgtgcagag aaacacatgg gctcaaaata 122940  
 aagggatgga ggaagatcta ccaagcaaa ggaaagcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 123000  
 aaaaaaaaaa agcaggagtt gcaatcccgg tctctgaaaa aaaagacttt aagccaacaa 123060  
 agatcaaaag agacaaaaaa ggccattaca taatggtaaa aggatcaact gggcaagaag 123120  
 agctaactat actaaatata taggtaccca atacagcagc accaagattc ataaagcaag 123180  
 tccttagaga cctataaaga gacttagact cccacacaat aataatggga gactttaaca 123240  
 cctctctgtc aataatagac agatcaatga gacagaagg tacaaggat atccaggaca 123300  
 tgaactcagc tctgcacat gtgaacctaa tagacatcta cagaaccctc caccocaaat 123360  
 caacagaata tacattcttc tcagcacgac atcacactta ttccaaaata gaccacatag 123420  
 aagtaagca cttctcacca aacgtaaaag aacagatctc acaacaaact ggctctcaga 123480  
 gcacagtgca atcaaatag aactcaggac taagaaactc actcaaaacc gcacaacttc 123540  
 atggaattg aacaacctgc tctgaaatga ctactgggta aataatgaaa tgaagacaga 123600  
 tataaagatg ttctttgaaa ccaacgagaa caagacaca gcataccaga atctctggga 123660  
 catatttaag gcagtgtgta gagggaaatt tatagcacta aatgccaca agagaaagca 123720  
 ggaaagagct aaaatcgaca ccttaacatc acaattaaaa gaactacaga agcaagagca 123780  
 aacaaattca aaagctagca gaaggcaaga aataactaag atcagagcag aactgaagga 123840  
 gatagagaca caactcttca aaaaatcaat gaatccagga gctgggtttt caaaaagatc 123900  
 aacaaaatag atacactgct agcaagacta ataaagaaga aaagagagaa gaatcaaata 123960  
 gagggataaa aaaatggtaa aggggatatc accaccgatc ccacagaaat acaaaactacc 124020  
 atcagagaat actattaaca cctctacaca aataaactag aaaatctaga agaaatggat 124080  
 aaattcctgg acacatacac cctcccaaga ctaaaccagg aagaagttga atctctgaat 124140  
 agaccaataa caggctctga aattgaggca ataatagcct accaaccaaa aaaagtccag 124200  
 gaccagatgg actcacagcc gaattctcct agaggtacaa agaggagctg ataccattcc 124260  
 ttctgaaact attccaatca atggaaaaag agggaatcct ccctaactca ttttatgagg 124320  
 ccagcatcag cccgatacca aagcctagca gagacaccac aaaaaataa ttttagacca 124380  
 atatccctga tgaacgtcga tgtgaaaaatc ctcaataaaa tactggcaaa cccaatccag 124440

ES 2 535 178 T3

cagcacatcc aaaagcttat caaccacgat caagtcggct tcatccctag gatgcaaggc 124500  
 tggttcaaca ttgcaaatc aataaacgta atccataaca taaacagaac caatgacaaa 124560  
 aaccacatga ttatttcaat agatgcacaa aaggtctttg acaaaattct acagcccttc 124620  
 atgccaaaaa ctctcaataa actaggtatt gatggaatgt atctcaaaat aataagagct 124680  
 gtttatgaca aactcacagc caatatcata ctgaatgggc aaaactgga agcattccct 124740  
 ttgaaaactg gcaaaagaca aggatgccct ctgtcaccat tcctattcaa cactgtgtta 124800  
 gaagtctctg ccagggcaat caggcaagag aaagaaataa agggatttca attagggaaa 124860  
 gaggaagtca aattgtccct gtttgcatg gatcacgactg tatattttaga aaacttggtc 124920  
 atctcagccc caaatctcct taggctggta agcaacttca gcaaagtctc aggatacaaa 124980  
 atcaatgtgc aaaaatcaca agcattccta tacaccata acagacaaac atacagccaa 125040  
 atcatgagtg aactattcac aattgctaca aagagaataa aatacctggg aatccaactt 125100  
 acaagagatg cgaaggacct ctggacctc tcaaggaaa ctacaaacca ctgctcaatg 125160  
 aaatacaaga ggacacaaac aaatggaaga acattccatg ctcatggata ggaagaatca 125220  
 atatcgtgaa aatggcgata ctgccaaaag taatttatag attcaatgcc atccccatca 125280  
 agctaccaat gacttttttc atagaactgg aaacaactac tttcaagttc atatggaacc 125340  
 aaaaagagc ctgcattgcc aagaccatcc taagccaaa gaacaaagct ggaggcatca 125400  
 cactacgtaa cttcaaaacta tactacaagg ctaccgtaac caaaacaaca tggtagtct 125460  
 acccaaacag agatagacca atggaacaga acagaggcct cagaaataac accacacatc 125520  
 tacaaccatc tgatctttga caaacctgac aaaaacaaga aatgggaaaa ggattcctta 125580  
 ttttaataaat ggtgctggga aaactggcta gccatatgta gaaagctgaa actggatccc 125640  
 ttccttacac cttatagaaa aattaattca agatggatta aagacttaa tgttagactt 125700  
 aaaaccataa aagccctaga agaaagccta ggcaatacca ttcaggacat aggtgtgggc 125760  
 aaggacttca tgatgaaaac gccagaaaca aaggcaacca aagccaaaac agacagatgg 125820  
 gatctaattc aactaaacag ctgcacagca aaacaaacta ccattagagt ggacaggcaa 125880  
 cctacagaat gggagaaaat ttttgcaatc taccatcag acaagggct aatatccaaa 125940  
 atctacaaag aaatttaca gaaaaaaca accccatcaa aaagtgggca aaggatatga 126000  
 acagacactt ctcaaaagaa ggcatttatg cagccaacag acatataaaa aatgcttatc 126060  
 atcactggtc atcagagaaa tggaaatcaa aaccacaatg agataccatc tcatgccagt 126120  
 tagaatggtg atcattaaaa agacaggaaa caacagatgc tggagaagat gtggcgaaat 126180  
 aggaacactt tcacactgtt ggtgggagta gtgtaaaacta gttcaaccac tgcagaagac 126240  
 agtgtggcga ctctcaagg atctagaact agaaatacca tttgaccag ccatccatt 126300  
 actgggtata caccaaaagg attataaatc atgctgctat aaagacacat gccatgtat 126360  
 gtttactgtg gcactattca caatagcaaa gacttggaac caaccctaat gccatcaat 126420

ES 2 535 178 T3

gatagactgg ataagaaaat atgccacaaa tatcccaagg aatactatgc agccataaac 126480  
aagggtgagt tcatgtcctt tgcagggaca tggatgaagc tggaaacccat cattctcagc 126540  
aaactagcgc aaggacagaa aagcaaacac tgcattgtct cactcatagg tgggagttga 126600  
acaatgagaa cacttgagaa catggcaggg aacatcacac aaaggggccccc gggggagggga 126660  
tagcattagg agaaatacct aatgtaaatg acgagttaat ggggtgctgca aatcaacatg 126720  
gcacatgtat atctatgtaa caaacctgca cattgtgac atgtacceta gaacttaaag 126780  
tataataaaa atatatatac atcactttac atccaaccag cactttgget ttgaagccac 126840  
tgcctgatgt tgacactttg tagatgtagt atgactattc ttatatgtct ctatctactg 126900  
atgaggatcc tactctttta gtataaagag taccattgac ttccaatcaa ctagtttcga 126960  
taatatctga aagatattaa ataacctgac actagcetta gtaaccgaca ccttactggc 127020  
cctactacta ctactaatta catttttact tccacaaatt aatatttata tagataaatc 127080  
cagcccctat gaaggcagat ttgacccaat aacctccaac tgcctcccct tttccataaa 127140  
attcttcta gtagccaaca catttctcct cttagactta gaaatcgctc taatactacc 127200  
cctgccatga gctattcaaa caaattacct aacaacaata atcaccacag cccttatact 127260  
agttatcatt ttaatcctag gcttaattta caaaagaact caaaaagggg tagattgaat 127320  
tgaattggta aatagtttaa gtcaaaaagaa atgatttcga ttcattagat tataataaac 127380  
catatttacc aatgcacctc tatttacatc aacattatat taccatatac catatcacta 127440  
ctggtaaaat taatctatca aaccaccta atatcatccc tatgtgccta gaaggcataa 127500  
tactgtcaat atttatcata attacctta taactttaa tatacatttt actctagcat 127560  
ctataatacc cattatcctc ctagtatttg ctgctgtgga agccgcagtg ggccttgct 127620  
tattagtttc aatctccaac acatacggcc tagattacac acaaaatcta aatttacttc 127680  
agtgtcaaaa attattccga caattatgct gttaccaata atatgattct ctaaaaattc 127740  
tataatctga attaacatga ccatccacag cctacttatc agcctcatca ccctattggt 127800  
ttttaaccaa ttcaacagta actcatcaa cttctcacta gttttctctt ctgatctgct 127860  
gatgtcacc ctcctaattt taacagccta ttacctttta taatctagc aagccaatat 127920  
taactgttca atgaatcacc cccacaaaa agctctatat ttctatattg atttccctgc 127980  
agatttttta aaattatagc atccacagcc acagaactaa ttatatttta tattttcttt 128040  
gaagccacac taattcctac cctaattatt attatcacc gctgagggaa ccaaccagaa 128100  
cgcctcaatg caagctcata tttcctattg tacacactag tagggtcctt tcctctactt 128160  
gttacacttg tctacacttt aaatacttca gattctctaa atatgctagt aatgatattt 128220  
actgaccaag aactgttagc ctccttatcc aataatctta tatgactagc atgtattatg 128280  
gcctttatag taaaaataac tctattcggg cttcacctgt gactcccaaa agcccatgta 128340

ES 2 535 178 T3

gaagccccta ttgccggctc aacagtactt gcagcgggtac tcctaaaact aggcgggtgc 128400  
 ggtataatac ggcttaccct tatcctcagc cccctaacag aatatatagc ctacccttc 128460  
 ctcacactat ccctatgagg gatagttatg acaagctcca tttgtctaca aaccgatgta 128520  
 aatcagtta ttgcctactc ctctgtaagc catataccac ttgtcatcat agctctccta 128580  
 atccaaaccc cttgaagctt tacaggtgcc gtcaccctta taattacca tggagtcact 128640  
 tcattccctgt tattctgcct agcaaattcc aactacgagt gagtccaaaa cggaatcata 128700  
 tacttacctg aggccttcaa atactcctcc cactgatata gcctcatgat gacttctagc 128760  
 aaatctcact aatcttgcct taccctacc attaacttag taagggaaact ctctgtgatc 128820  
 atggcttcat tctcctgatc aaacatcact attatgctta caggacttaa tatactaatt 128880  
 acaaccctct actccctaca tgtaccaatc acaacacaat gagggacact tacatattac 128940  
 attaacagtt aaaccttcct ttacacgaga aaatacatta atatttatac atgttacacc 129000  
 tattcttcta ttatcctaaa tcctaaaatt attatgggct ttacatgctg tagctatagt 129060  
 ttaacaaaa cattaaattg tggatctaata aatagaagcc tgcaacttct tatctaccaa 129120  
 gaaagtatgc aagaactgct aactcatgcc cccatgccta acaatatggc tttctcaact 129180  
 tttaaaggat tggagtcatc cgttggcctt aggaaccaa aacattgggt caactccaaa 129240  
 gaaaagtaac aaatatgtat tttccacta ctataatagc cctaactgcc ttaatcacac 129300  
 caattattac gttagtcaac cctgcaaaa gaagattcat acccaaatta cataaaaata 129360  
 gccatcacat gcgccttcac cattagcctc atcccaacgt ttatatatac agaccaagaa 129420  
 gtcattatct caaactgaca ttgaatgaca atcccaactc ttaaaactct actaagcttt 129480  
 agactacttc tcataatat ttattctagt agcactattt gttacctgta gaattctcaa 129540  
 tatgatatat aaactcagac cetaacatta atcaattttt caaatatttt cctcatcaca 129600  
 gtattcttcc aatattccac caacaaactc tttcaactct ttatcggatg agaaggtata 129660  
 ggaatcatgt ctttcttact aactggctga caatatggcc gagcagatgc taatacagca 129720  
 gccctccaag cagtctgca caatcgcatc ggcgacattg gttttatttt agttatagca 129780  
 tggttcctct tttcctcaa cacatgagag attcaacaag cattcattct aaaccctacc 129840  
 tctaatccc ttccattaat tcgccttctc ttagcagcag caggaaagtc agctaaattc 129900  
 ggcctccatc cctgacttcc atccgccata gaaggcccaa cccagcctc agccctgctc 129960  
 cactccagca ctatagttgt agcaggagtt ttctgctca tccgcttcta ccctttaata 130020  
 gaaaaataacc tctgaacca aacctttaca ttatctccag gggctgttac caccttattt 130080  
 acagcaatct gcgctctaac acaaaatgat atttaaaaa tcatagcatt ctccacctca 130140  
 agtcagctgg gccttacgat agtcacaatt ggcattaatc agccacatct agcattcctt 130200  
 cacatgtgca cccacacctt ttttaagct atattattta tatgctcagg ctccatcctc 130260  
 cacaatctca atgatgaaca agatatttga aaaataggac tattcaagac tttacccttc 130320

ES 2 535 178 T3

acttcctcct cccttattat tggtagcctt gcacttacag atatgccttt cttcacagge 130380  
 ttttactcta aagaccttat tatcgaaacc acaaatactg tcatatacca acgcctgagc 130440  
 cctttctatt actcttactg ccacctcctt aactgctggc tatagtaccc gtgttatttt 130500  
 ctttgetctg cggactggcc atgcaggagt ggtaagggcc cgggccacgc gcgacgcctg 130560  
 ggggccctgc tgcacgccc gtttgctcgg ggaaggtggg ggggacgctt catgccgccg 130620  
 cgcccagcag ggtttccatg tctgagatgc ccgctctggc cccaagagaa tgaaccagcc 130680  
 gcagaggatg gcacccgtgg acacggacaa ggagctcagt aacctggact tcagcatgat 130740  
 gttcccgcctg cccgttgcca acgggaaggg ccggccccgc tccctggccg gggcgcaatt 130800  
 cagaggttca ggtcttgaga actggcccag ctcaggctcc tggggcagcg gcgaccagaa 130860  
 cagctcctcc tttagaccca gctggacggt cagcgaaggc gctcaacttg ctgagtcgca 130920  
 cggcagccac tctccattca cattcctggg accgggactc ggaggcaaga gcagctagcg 130980  
 cgggcctatt cctcctttgg tagagacgca ggcgtgcgca gcctgactca ggetggcttc 131040  
 ctgccgggca agctggccct cagcagcccc ggaccctgt cccctcagg catgaagggg 131100  
 acctcccggg actaccctc ctacgccagc agctctggcg gacagaggcg gacagcggcc 131160  
 tggacacgca gccacgaag gtcgggaagg tcccgcctgg tcttccatcc tcggcgtacc 131220  
 tgcccagctc aggtgaggag tacggtaggg atgccgccgc ctatccatcc gccaaagacgc 131280  
 ccagcagcgc ctgtcccgcc cccttctaca tggcagatgg cagcctgcac ccetaagccg 131340  
 agctctggag ttccctgggc caggtgggct ttggcccat gctgggcggg ggetcatgcc 131400  
 cctcgtccct ccgcccagc agcggccctg tgggcagtgg cggaggcagc agcagctttg 131460  
 gcggcctgca ccagcacgag cgcgtgggct accggctgca cggaggagaa gtgaacgggtg 131520  
 ggettcgggc tgcacccacc ttctccttgg cccccggagc cacgtaggcg gcgtctccag 131580  
 ccacacgcct gtcggcgggg ccgacaacct cctgggctcc cgagggacca cagccagcag 131640  
 ctctggggac gccctcggga aggctggcc tcaatctact ctccggatca ctcaagcaat 131700  
 aacttggtgt ccagcccctc caccgccgtg ggctcccccc agggcctggg agggacgtcg 131760  
 cactagcctg gagcaggagt ccctgggtgc ttatcaccca gctacgacgg gggctctccac 131820  
 ggcctggaga gtaagataga agaccaccta cctgaacgag ggcattccacg tgctctgcag 131880  
 ccacgccatg ggcacggcta gcaacgtgca cacgctgcta cccggccacc gggcgtggc 131940  
 cttgggcttc gccggcccc tgetgctggt gggggcagca cgcaggcctg gttggaggcg 132000  
 aacaccctga ggacggccct gcgggcagcg ccagcctcat gcacatccat gttgcctct 132060  
 ccagctagcc aggcgccctc cccgacctct cttggccttc cgaactcctgc agtgggctag 132120  
 ggcgagcagg ccaactggga aatcaagcgg gaggaggagg atgaggagaa cacgtcggcg 132180  
 gctgaccact caagaggaga agaaggagct gaaggacccc cgggaccgga ccagcccaga 132240

ES 2 535 178 T3

caaggacgag gaggaagatg accttttccc cccagagcag aaggccgagt gggagaagca 132300  
ggtggccaat aacgccaggg agcggctgcg ggtcccttaa gagggctctt aaggagctgg 132360  
ggcgcgatg gcaactgcac ctcaacagcg agaagcccca gaccaaactc cttatcctgc 132420  
accaggccgt ctcggtcatc ctgaatttgg agcagcaagt gcgagagcgg aacctgaatc 132480  
ccaaaacagc ctgtttgaaa cggcgagaag agaaggtgtc gcgctgttc ggaggcccc 132540  
agatggtgct ttcagctgcc cacctgggct tgagtgaagc ccacaacccc gctgggcacg 132600  
tgtgaaaggt acgcctccgt gggacgagcc acccgccctc agccccgtgg gctgggcccc 132660  
gaacgcccac ttgaggccct gggcttcatc cacatccaca cctcacacaa ctggtgtcag 132720  
cattgagcca acaccgacct gatgaggctc agagtgatgg gggcaaggaa ggtgagtgat 132780  
gggggtgagg aaggtgacgc tgggtccagg agctccctgg gacccccggt caccctcac 132840  
tgcctcgtc cccctgccc ccgtatctca gccaccatgt caccctgtga cctgccccat 132900  
ggaccctgaa actgcatctt ggccctgttg tctgggctgg caggagcttt ttttttttt 132960  
ttttttttt ttttccagt aaacaaaacc tgaatgcaag caacaaaaca tacactttgt 133020  
cagaaaagaa aaaaatgcct taactataaa atgtggagaa atcgtaacat atcacttgag 133080  
ggagatgctg tggaacttg gcttattctt caaagccag cagcaaattg tgcctaagcg 133140  
taatttttt taaggaaaat aaaaagaaca ttagttattt aaaaaaaaa aaaaaaaaa 133200  
aaaaaccgg actgacctg gccaggctgg atcagactgg cctagagtag acttcagagg 133260  
gtgactcccc tgggtgggctg gtctcagctg atcttgactg tcccgctcc acacagggcc 133320  
catccatctt ccccttgatc cctgctgca aagacattgc ctctgatgcc acctccatga 133380  
acctgggctg cctggccaca ggctacttcc tgaagtcagt gactgtgacc tgggacacag 133440  
gctccctcaa caggagcgt gggaccttcc cagccaccac cctcacgccc tetggccatt 133500  
acgccatcac cagccagctg actgcctcgg gtgcgtgggc caaacgctca cctgcagcgt 133560  
ggcacacact ctgtggtccg cagaccaggt cagtacctc agcatctact ccagggactt 133620  
caccctcccc accgtgaaga tcttacagtc ctctgtgat ggcagtggac acttaccccc 133680  
gaccatccag ttcctgtgcc tcactctctg gtacaccag gtgccatcag catcacctgg 133740  
ctggaggatg ggcaggctgt ggatgtgaac tggccatcg cctctcccat actggaggat 133800  
gagctggcct ccacacaaag caagctcacc ctcaccaga agcgctggct gcccgaccac 133860  
acctacacct gccaggtcac ctatcaaggt aacaccttg aggacagtgc caagaagtgt 133920  
gcagattcta acccgcaagg ggtgagcacc tacctgagcc ggtccagccc cttctacctg 133980  
ttcatccgca agttgccac aatcacctgt ctggtggtgg acctggcacc cagcaaggag 134040  
aacgtgaagc tgacttggtc ccaggccagt ggaagctctg tggctcaggt catcctaagg 134100  
caagagaagc agtgcaatgg cacgttacc atcagctcca cctgctggt gggcaccaga 134160  
gactggatca agggggagac ctaccagtgc aggtgaccc acaccacct gcagtccacg 134220

ES 2 535 178 T3

accaagatca ggggccatg tgctcccca caggtctacg tgtttgcaac gctagaagag 134280  
 ccgaggaacc aggacaagcg caccctcacc tgctgatcc agaacttctg gcccaaggac 134340  
 atcttgggtgc agtggctgta caacgagggtg cagctcccgg acacttggca cagcatgacg 134400  
 cagccccgca aaaccaaggg ctctggcgtc ttagtcttca gctgcctgga ggttaccagg 134460  
 gctgaatggg aacagaaaaa cgagttcatc tgctctgtgg tccatgagac agcgactggc 134520  
 tcacagaccg tcaagtaact gttgtctgta aatcccatta aatgtcctcc tgccttctc 134580  
 cccactaggg ctctgtccag ctgtgtgggtg ggaagggtg gccagacctt ctgtccactg 134640  
 ttgcaatgac cccaggaagc ccccccaat aaacagtgcc tgctcagaaa acaaaaaaac 134700  
 aaacaaacaa acataaaaaa cctagaggaa aacctaggca ataccattca ggacataggc 134760  
 atgggcaagg acttcatgac taaaacacca aaagcaatgg caacaaaagc caaaatagac 134820  
 agatgggatc taattaaact aaacagctgc atagcaaaaag aaactgatca gagtgaacag 134880  
 gctacctaca gaatgggaaa aatTTTTTgc aatctagcca cctgacaaaa ggctaataatc 134940  
 aagaatctac aaagaactta aacaagttca caagaaaaaa acaaccccat caaaaagtgg 135000  
 gtaaaggata tgaacagaca cttctcaaaa gaagacattt atgtggccaa caaacatatg 135060  
 aaaaaaagct catcatcact ggtcatcaga gaaatgcaaa tcaaaaccag agtgagggtac 135120  
 catctcatgc cagttagaat ggcgatcatt aaaaagttag gcaacaacag atgetgaaga 135180  
 ggatgtggaa aaacaggaat gcttttcatc tgttgatggg agtgtaaatt agttcaacca 135240  
 ttgtggaaga cagtgtggca attcctccag gatccagagt tagaaatacc atttactga 135300  
 gcaattccat tactgggtat atacccaaag gattataaat catttacta taaagacaca 135360  
 tgcacatgta tgtttattgt ggcacttttc acaatagcaa agacttggaa ccaacccaaa 135420  
 tgcccataca tgatagactg gataaagaaa atgtgacaca tatacccat ggaatactat 135480  
 gcagccataa acaaggatga gttcatgtcc tttgcaggga caaagatgaa gctagaacc 135540  
 ataattctca gcaaacacag gaacagaaaa ccatacacca ctgttctcgt ctgataagtg 135600  
 ggagttgaac aatgacaaca tatggacaca gggaggggaa catcacacac cagggcctgt 135660  
 tgttgggtgg agggctaggg gagggatagc ttttaagagaa atacctaatg tagttgatgg 135720  
 gttgatgggt gcagcaaac accatgacac gtgtatacct acgttaacaa acctgcacct 135780  
 tctgcacatg tatcccaaaa cttaaagtat aataaaatTT aaaaaaaaaa cagtgaacat 135840  
 ttattgtagg cttacattgg gctaaatgca ttttatggat aatctcattt aatcctcata 135900  
 acaacccttg gagaacatgt atgattatta tctctatTTT aagcatggag aactgaatag 135960  
 cttacccaag gtggcatgac tagtaaatca ctggaccagg atttaaccc aaaaagtctg 136020  
 atcccagagt tcatgcttat aagccttct aacctgata atgctttaat ctggcattaa 136080  
 ttgttctcta atttgggtag gtttgaatt tttcataata aatattaaaa atactTTTTg 136140

ES 2 535 178 T3

aggaaatgtc gtcattgataa acattagaac tgcgttcacg taattacttt tagggatga 136200  
 gtgaaactaa aaagtaagac tcatctaaaa ataactcatct gttttggcca tatccccagt 136260  
 gatacatgaa ttttaattggt tttattgttt tcagaatgaa aaattaaaga ggtaaataa 136320  
 aattagctgg caatcaaaaa atattagtta tatgaagatt cagagatttg gttatactta 136380  
 atgaatacaa gctaataaat atttattaag actctactgt gctccaaata ctatacaggg 136440  
 aggtagggat atgaagatag gcttagcatc agaaaaggac tgtcccttag tagaaaggct 136500  
 gaactaaaag gaaaagtttg acgtgatagg caaattcaac tgacaggctcc actaccata 136560  
 gtccttcaaa gagctcataa ttaggaaaag tcatatgtat aatatggcac tttcaataat 136620  
 taagtgcaat aagtgtaagt gcaataatta aggtactggg aaaacataac agtacaata 136680  
 attcagctga agatttatgt aagataacta agatgacatt tcaacgattg gttgaattga 136740  
 cctctccctc atgaatggga ttaaggccct tataagaggc ttcattgcagc atttgctcc 136800  
 tcttgctttt ccactttcat ccatgtgagg acacggcatt cctctcctct aaaagatgtg 136860  
 gcaacaaggc tccccttggg agcagagagc agccctcacc acacacctga acctgccagc 136920  
 acctttatca tggactcca acctccagaa gtatgagaaa taaatttctg tttttataa 136980  
 attatccatt gtcaggact ctgttatagc agcatacatg gacgccagc acatcatggt 137040  
 aatgagttca gaccttcttt agtagacagt gcgtaagggt ggaaattaga ggctttatcc 137100  
 aggggaataa catggtgaga ttcataatgt agaaagatag ctctactttt gttatagaac 137160  
 agcagttctg aaagtgtggg gactttaggg tgtctgtgaa gtaaaaaata ttttcataat 137220  
 aatggatggt atttgctctt ttcactcatt ttttcataag tatagtttcc cagaggcaat 137280  
 aagatatggt ttctatttaa ccaaacattg aagagacttg caaaaatgta aaacaatgtg 137340  
 actcttatca aagtttattt tggaaatagt tgttttccat aaaatacatt acttatgtta 137400  
 acaggtaatg gttttatctt aaataaatta ataaatattt ttatatttta ttagctttaa 137460  
 tatttaatat ggtaataact ggtagatata actcacagaa acaaaagttt tttggcaacc 137520  
 tcagtaattt ttaagagtat acgaggaagc ctgagatcaa aagctttgag aactactgac 137580  
 agaggggagc ttgtattaat gagaggctaa tagtagagag gcagctaatt agattttatg 137640  
 aggatctagg cactgggtt tcaaaccttt taagtatata tgctcactaa aagaatttag 137700  
 aaaaaccaca tcctcttaca cattttttaa ttgatagcta attttttctt ttgtaagtag 137760  
 ttataatgta ttttctaaag tactgtaaat attgacattt aaataacagc tatgtcaatc 137820  
 ctttaaagtgt gtccaactga atctaaatag tgcttgagc gagcggagac ctgccactg 137880  
 cactccagcc tgggagacag agcagagctc catctcaaac aaacaaataa atagtgcagc 137940  
 aatttgatac ccacttatca cccacttaa aagattatat gaatagactt ttattttttt 138000  
 gtacaaactt tgtatcttc cttttctct ttaaaatagt attcccactt cccttctcat 138060  
 tccaaatgtt gcataaatg ttacacttg tatttgata atottatgat cacctatgtt 138120

ES 2 535 178 T3

ctttgaacc aagatatgta tataagtaag ttgaaattaa ttaaaaattt tcctgtgacc 138180  
 aacaaaacttg taactattca ctttttctt ctgggttatc attgaagtta ctaggataca 138240  
 gttttccaaa gcaatgtaaa taacaaattt ggataattgc tttaaaaatt ttattggtga 138300  
 atggaacaat ccctcccctc caattggtt gtatatcctc ggatgaatat tatttatttc 138360  
 tataatggga caagattaag cataaattct gtgttcattt tgcactttac agatgtaaac 138420  
 gctgagaaaa cttgtttgtg taagtgagtg gacaggaatg gaaggagtth tgttataata 138480  
 gtatcattca tttctatgac gccttctgag atatgcagga aaaaagtaca gtaataacc 138540  
 attaaaaatt atctgttatt gggcagtthc atttgatcag atccattatg tttcaatttt 138600  
 attaaaagca gagaattaaa accactgac tttcaaaaat gagtttacta accagtcac 138660  
 aggttcatct gttttctcaa tttctgaaa gtataccaaa aagcttttaa aattaattcc 138720  
 aactatatgt tacactttca cgtggatgta cctgtttta actaatacat tcagaaaagt 138780  
 ttgaaaaaac agactattat taatacatta ttattaacat attttatcat gttttaaata 138840  
 tatgatttaa acacagcaaa cctctcagct acctcaaagg ttgagtagat tttgtgaga 138900  
 atgtccttca tacaacccat ttggaatgc caggcatcaa acaaatcact taatttctgg 138960  
 cagaaaaact cagacttcat ttttcaagtc actaaatata ttaataatat gtgattttt 139020  
 taaaacctga gaaacaaatg acagaacaaa tgcattggagg tatgtttatt atgaagctaa 139080  
 tgaagcatat ccagaggctc tccttccaag gttcctttct aattttaaat agaaaattat 139140  
 gcactttcat gtataattht gtattctttg tcataatgaa agcctaaaaa aaaaaggctt 139200  
 caaattatat aagctttggg acctgtatct ctgcctatac atgtgaaaaa atcatgaggg 139260  
 cagtcaggat aagctgaaga tgatatatat atctggcata attaatthca tattatgaaa 139320  
 ataagataat ttctcattac ttaatttgca ataaataata cagagtaaaa tatggctaag 139380  
 attataactt atgaagtaag gtatatggta catggcatgg tcattccttc agtaaatgtg 139440  
 ttaggggggag gtatgaagtg aattctgact ttggggaata attagaagca actgtatga 139500  
 aatcagaaa taacttattt ttctcatga tcaaaattt catatgtact taatgaacac 139560  
 aaaaaatata tactgctaaa agcaaatcag gcagttagca tatagtttta tttttatatt 139620  
 tgcaagtaga aaataaatat tttatacaat gaaatgaagt tcattaaatt ttatgtaaat 139680  
 attttagaat atgaattgat aaaataagtt tgagctaact tattgaataa taaacactgt 139740  
 cttagtccct ttatgctgct ataacagaat acctgaaaat ggataattta taaagaacag 139800  
 aaatttattt ctcacacttc tagaggttag gagtccatga aaaaagtgtc ggcaggttca 139860  
 ggcgtctggg gagagctgct ctcttcttcc caagatggag ccttgctgct tcctccttca 139920  
 gagaggagga acaccatgct ctcacatgga caaaagtgga agggcgagag gggccaaatg 139980  
 ctgcatgaag cctctcataa gggccttaat cctattcatg agggagaagc cctcatggcg 140040

ES 2 535 178 T3

taatcatctc ttaaaggccc cacctgttaa taccatcaca ttaacaacac ctgaattttg 140100  
 gaggagacac atagcaaaca ctaaactctga agtctgaaag aactcaattt ttattcacag 140160  
 gattttgccc atgatatcat ttttttaaaa actcaatttc atttaaaaga aactttgtta 140220  
 tctatattgt ttttcttgtt cgaaaaggct cttttgtttt aagctaacaa tatgggtgac 140280  
 ggtaataact gggggaaaaa gtgcctctgc ttaaagtgtg taaaaaatcg gtgaaacagg 140340  
 attttgact cctggaggat cctttactct ttttactaca gaagtacca ttggatgatc 140400  
 tttgtacatt attcttcacc ttgtgtgaag acctctgtgc tagtcatgag ataaggatgt 140460  
 gatgtaaact gtaacaatgg gttaggagac tgattggaga tatttctaag ctatactcta 140520  
 aagggactta gtgggtcatt agacactgga gtgaaagatg cgtcaaaaat aattaagatt 140580  
 ttcaaattga gcagctaaat agattgtgat gctatttatt gcataagaaa caaataatc 140640  
 agcaagtttt ggaagagga tggaaattctg tttgcctata gatctttaat gtggaaatgt 140700  
 tctaaaagtc tggagcacta aacaaaggtc aaagatatgg ttataaattt ggggacttt 140760  
 agtatatag tggatgatac tatctaaggg aaagttttta accaagagag gaataaatct 140820  
 gatgaagaga ccctgggaaa ccttcaattt agaagaggca gaatagtagt agtagtggtg 140880  
 ggaaagtata attgaaaaca aaactttcca acccagaaaa cctttccaca aagatagaag 140940  
 gaaaacaatt ttatgattga gtaagcatta gagcaggatg tgatgtgtat cacaagcagt 141000  
 ccctaagag atttgcaaag acagaaggaa atctcacctt tttatatagc caacctgata 141060  
 taaccctttt cattcaagtt cttaggataa acattaacta gtocctcaagt aagaagactt 141120  
 gacagcacta tttgccacat acgtagttta ttctaaattc acttggtaat tggagtgact 141180  
 ttgctaattg gctttataca aaggaaaata cacttttcat atcttcatga caggaggtag 141240  
 ttttgagct tggaggagg ctctgtctga agttaggctt ctactcccac agaaactggg 141300  
 agtaagggtg ctatcttctt tgatgactga attccaaga gatagttaca cgttcttgag 141360  
 aaagacattc atgggtcaca aaactggcaa gaggctttga agcaagagat ttttaaaaga 141420  
 tttacataca cttcaaaaag acaagaatt tacaagtttt ctgaatgctc taagaacaaa 141480  
 gaaggaggag tctttcttct tattttcaac aaggggaatt aattttgttc tttttaaatt 141540  
 tgtatttacc cttacataag tgatagaaca gacagaaaaa aacagctgtg gaaatgtgag 141600  
 ggaaattaca atgagtgtca tatgaaaacc agaggaagag catattttgc aaggagttag 141660  
 ggaatagtgc tgtcttcaag aactttgcat tccccttgtg gaataaaaact aacatacatt 141720  
 tgataataac ataactagat atgtaaaatt tgtaaagact aaatgtaaaa agaatatagc 141780  
 attaggatgt ttaattacgt agtatggact gccagtacta taggaattca gtggcctgag 141840  
 ggcaataaga cctggagtag gcagggaaagg atttgtggag attaggaac ttaaattggga 141900  
 ttttgaagga gagattaaat ctatgtaatt cacattttta atatcagtct aaaacacatc 141960  
 tctgtagctg tctctataat aaagataaac ttagcaatgg aaccatgata ctcacagtcc 142020

ES 2 535 178 T3

actaggccaa aacgttcctt tggatagtgt taatgcttga gtgaacaatg acaccattgc 142080  
 tgtgactttt tcctttctgt attccttagt caccctctt ctggtaaca ggttctttct 142140  
 tttatagctt taagtcttgc cttggaacca attttttct ccagcatatt tatatggatt 142200  
 catttaaagc ttaacttgca aagagcagct tattttcact tcttagaagg tactctgcag 142260  
 ttaaccttgg tgctgtctac agagacaaaa ataaatttct ttggatttta gttatctttc 142320  
 tatgtcagag attccaaga ccatccccag gttgacgatt tgctaggaag actcacagga 142380  
 ctcagcatat atccatattc atggttatga ttcattatag ggaataaca taaagcaaaa 142440  
 ttaggcactc tccgcctggc acatactaaa gttacatact cccagaagaa aagtagatgt 142500  
 cagcataaac cgtattgttt gtacaaaaca tctaggcata gtgagtcact cttatttagg 142560  
 gaattgtgga atccctcctg aaatctaagt tcacaggtgc caggcaaaaa ggcctttta 142620  
 atcatagaag cctcaggcct gctgtgataa ctcttttctc tacatgtttt ttttttaat 142680  
 ttatacaatg atttgcaggt aaaatcaaga gtccacatat caagtaactg tcttttaaat 142740  
 gttattcata ttttacagg tatgtctcag aatcactgac agagagcaag tttctgtgg 142800  
 cctcagatgt ttggagcttt ggagtggttc tgtatgaact tttcacatac attgagaaga 142860  
 gtaaaagtcc accagcggtc agtgtgcttt ttatttactt tcagtttttt gtttgttctg 142920  
 ttgattttta taaatttatg gggtaacaagt acaattttgc tacatgcata cattgcatag 142980  
 tgggtgaagtc agagctttta gggtatccac caccttaata acatacattg tatcccttaa 143040  
 ataatttctc agcatctact ccaccaatgg ctcacccttc caagtctcta ttgtctatca 143100  
 ttccacattc tacgttcatg tgtatacatt atatagctcc cgcttataag tgaaaacgtg 143160  
 gtatttgtct ttctatggct gatttgtttc acttaagata attacctcca tccatgttgc 143220  
 tacaaaagac ataatttcat tcgttgttat ggctgaatag tattccattt tgtatgtata 143280  
 ccacattttc tttatccagt catccactga tggacactta ggttgattcc atgtctttgc 143340  
 ttttgtgaag aatgctgcaa taaacataca ggtggaggta tctttttgat acagtgattt 143400  
 cttgtccttt aggtagatac cccatagtgg gaatgctgga tcgaatggta gttctatatt 143460  
 taggtctctg agaaatcttt ataatgtttt ccatagaggt tgtacaaatg cacattctca 143520  
 ccaacagtgt ataagagttc ccttttctcc acacccttgc caacatctgt tattttttct 143580  
 ctctctcatt ttttttcca ttctgactgg agtcagacat atctcactgg ggtaattttt 143640  
 tctctttttt tttttgtca ttctgactgg aataaggcat atctcattgt gattttaatt 143700  
 tgcatttctc tgggtgattag tgattagcat tttttcatat gcctcttctc agtttgggtg 143760  
 tcttcttttg aaaatgtcta ttgatctcct ttgtccactt tttaacacga ttattagggg 143820  
 gttttgggtg aattgcttga gttccttata aattctggat ggtagttcct tgtcagatac 143880  
 aaagtttgca aatattttct ccgattatgc aggttttctg ttcattctgt tgattattga 143940

ES 2 535 178 T3

ttttgctatg ctgaaatfff ttagcttaat aaagtctcat ttgtctatff ttggffffgt 144000  
 tgcctatgct tttgaggtct ttgccatgaa ttctttgtff aacttcattf ccattaaagt 144060  
 tttctctaggt tttttttct agtatttttc tagtttcaga tcttacattf aagtctgtaa 144120  
 tcatcgagt taatfffct atattggtgat aaatatgggt ccagtttcat tcttctgcat 144180  
 atggcaatcc aattaccag caccatttat tgaagggt gtctttccc atactgcga 144240  
 aagcaatctg cagattcaat gcagttccta tcaaatacc aatgtcattf gttcacagaa 144300  
 ttagaaaaaa caatcctaaa atccataggg aacaaaaag gcccctaata gcaaaagcga 144360  
 ttctaagcaa aaagaacaaa gctggaagca tcacattact tgacctcaa ttatattata 144420  
 aggctacagt aaccaaagca gcattggtact catataaaaa acaaacacat agatcaatgg 144480  
 aacagaatag aaaaccaga aataaagcca caatffata gccactgat ctttgacaaa 144540  
 atcaacaaga acatacttc aagttffff ttaacatgag aaaggattta tccaaagaat 144600  
 agtaagccta ggactcactt tagagctfff attgcttatt ttttaaggcaa tatcaaaaa 144660  
 aataatccca aacctattcc taaactagct tgaatffta aaaaggggat attgggaagc 144720  
 tagttagtag agtctcttaa tattactfff attaaatcca gtaagctaat tcattctagg 144780  
 aattattgca taagttaaaa taaaccttc aaagtaatff ttctcttgggt catcatagaa 144840  
 ttttttttaa tatggaaaag tatgaaaaa taaaatcat ctctaagca attactcaga 144900  
 gaagaccacc tcaatattgt ggtatgttac ctttcaggct tcattttgtg tataaaagta 144960  
 tatacaaaaga agtatataaa acttttataa cttttataaa agttcactta tataaatata 145020  
 tattatffta taaaattaag gtcatactgt gcagtttgt ctctctctgt tcatgaagt 145080  
 attacagcat gggtaatff ctgtattaga aaaatgtact gcaaatatgt tttctaattg 145140  
 ctgagtagca ttccatcata aggctatata tgtctgaaca atcattffcc attcttcagt 145200  
 cttttaagta aacttcagt gaacatagtg aacatcctca tgcataaata tttatattta 145260  
 tctctgataa ttatcttaga ataaaagtat aagtaaaagt tatgaactat tttaaaatff 145320  
 ttttaatffc aaaatgctff ctagaaaagc tgtgccaaat tatatctcaa cagcaatgca 145380  
 tagggatgta catttcatca tttgccacta ttggttatta tattfftatg tactfftgcc 145440  
 aagttgatag gggagaagtt atatatatff taatttccat ttctffctt aatgtggttg 145500  
 actatatatt tgttgggtgt ttagggtggg tatgtatata tgtgaattat ctctctctgtg 145560  
 ctttgccat ctttatatff gtaatfffff ttcccaatff ataagagctg tctatattga 145620  
 aaataagtaa atgatgtff agtattffcc tagcttataa ttcagatff aatfftataa 145680  
 actffgacat atgaaagfff tctffgttgt atffatgctt atccattcat tttffcttat 145740  
 atctctffff atattcaact tfftatffca atfgaaatgt aatattgataa aaatatgagt 145800  
 tffftaaca caaaaaactc aaaggaaata tgtffftagt tcatgtgfff tgagccctcc 145860  
 tcaggggatt tgtgttgagt ttattacagc tatggaaatg gaaattatag aagttccata 145920

ES 2 535 178 T3

tttaacagcc ttatgttttt gatcctaaaa gtagtttggt ttgaaaaggt ttgaaaacat 145980  
 acaaaaagcac acatatacta aatTTTTTcc cattgactgg aggaaattga gaaagaattt 146040  
 tgctacaaat taaatgtaca aaaaatattg aaagtgggtt tgttttagga atttatgctt 146100  
 atgattggca atgacaaaaca aggacagatg atcgtgttcc atttgataga acttttgaag 146160  
 aataatggaa gattaccaag accagatgga tgcccagatg aggtaacaat ttttttttaa 146220  
 tccagggtag tcatgcattt tcttttactt tttactcaag gacttcagtt cacttctga 146280  
 aatttaagt ggggagcttc cagataaaca gcataatcag atgactgtgg aacaaggcat 146340  
 ggttatgaca tgtgccctgt attgaaaatt aatgtcttcc accaattaaa agatggccct 146400  
 tagtgttcat ttaattttgg tttatTTTct cctttacaga tctatatgat catgacagaa 146460  
 tgctggaaca ataatgtaa tcaacgcccc tcctttaggg atctagctct tcgagtggat 146520  
 caaataaggg ataacatggc tggatgaaag aaatgacctt cattctgaga ccaaagtaga 146580  
 tttacagaac aaagtTTTat atttcacatt gctgtggact attattacat atatcattat 146640  
 tatataaatc atgatgctag ccagcaaaga tgtgaaaata tctgctcaa actttcaaag 146700  
 tttagtaagt ttttcttcat gaggccacca gtaaaagaca ttaatgagaa ttccttagca 146760  
 aggattttgt aagaagtttc ttaaacattg tcagttaaca tcaactcttgt ctggcaaaag 146820  
 aaaaaaata gactTTTTca actcagcttt ttgagacctg aaaaaattat tatgtaaatt 146880  
 ttgcaatggt aaagatgca agaatatgta tgtatagttt ttaccacagt ggatgtataa 146940  
 taccttggca tcttgtgtga tgttttacac acatgagggc tgggttcat taatactgtt 147000  
 ttctaatttt tccatagtta atctataatt aattacttca ctatacaaac aaattaagat 147060  
 gttcagataa ttgaataagt acctttgtgt ccttgttcat ttatatcgtt ggcagcatt 147120  
 ataagcaggt gtatactttt agctttagt tccatgtaact gtaaatattt ttcacataaa 147180  
 gggacaacat gtctagtttt atttgtatag gaaatttccc tgaccctaaa taatacattt 147240  
 tgaaatgaaa caagcttaca aagatataat ctattttatt atggtttccc ttgtatctat 147300  
 ttgtggtgaa tgtgtttttt aaatggaact atctccaaat ttttctaaga ctactatgaa 147360  
 cagttttctt ttaaaatttt gagattaaga atgccaggaa tattgtcatc ctttgagctg 147420  
 ctgactgcca ataacattct tcgatctctg ggatttatgc tcatgaacta aatttaagct 147480  
 taagccataa aatagattag attgtttttt aaaaatggat agctcattaa gaagtgcagc 147540  
 aggttaagaa ttttttccca aagactgtat atttgagggg tttcagaatt ttgcattgca 147600  
 gtcatagaag agatttattt cctttttaga ggggaaatga ggtaaataag taaaaaagta 147660  
 tgcttgtaa ttttattcaa gaatgccagt agaaaattca taacgtgtat ctttaagaaa 147720  
 aatgagcata catcttaaat cttttcaatt aagtataagg ggttgttctg tgttgcatt 147780  
 tgttatagt ctactccact ttagacacca tagctaaaaa aaaatatggt gggttttgtg 147840

ES 2 535 178 T3

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgttat ttatacaaaa cttaaaatac 147900  
 ttgctgtttt gattaaaaag aaaatagttt cttactttat ttttactggt atgttctact 147960  
 tttttgaaag ttgtactgaa gacttctgat tttgggttga agggaaggaa aaggaagaaa 148020  
 tgttttttac attcattatt atacttaaag cattttttaa gcattttaat agttctggat 148080  
 gcagaaatca tctaaaatga cagtgaatta ggttttataa agattttaga tttttttgaa 148140  
 agtttaattt ttatttgtaa agactcctca aggatttgta tatgcaacac agtaaggaga 148200  
 tcttccattt tactaccttt caagtgaaaa atagcctatc atacaatatg cttgatttca 148260  
 gattttcata ctaaaactta actacatact taaaagtagg ttcttatcaa gggctcttaa 148320  
 cattgctttt taaaacaaga tgtgaactaa cttttcttaa acattttttt aaatgcttca 148380  
 tcttttagtt ttatataaag aatcccacat gtacattcct gtttttagaa tgggggtgact 148440  
 accttattat aaaattccaa gttccaaga gacttctttt cattgaggct tcgtaaagtt 148500  
 ttccattttg attctgacta cacataaaaa taagataacc ctgtagttat taagttgggt 148560  
 ctgtacaaga aacaggtaag taattatgt accagttaat gccaaaatat ttttcacggt 148620  
 aatattcttc agaacaagg gtaaaggat tcttagaatt atgtaattct gtaactattc 148680  
 cagtatatta agttatacaa tctttatata aatgactttt tccatgggta cttgtttgga 148740  
 aaatagtcac tttttcacgc tttttatata tgctgccagt aacactataa tttgctatgg 148800  
 aagagtgttc tttaaccta aggcttctag ttacagtca agtgtaattt tcatcacaac 148860  
 tataacttct ggtattttaa ttttatftaa acagctacaa aagagttagc aaatacctac 148920  
 agttctgtat ctatagagcc aatcttgatg gtgggtgtgg cattatgtgc tcaactttatt 148980  
 gagcctatgt taatttcttt agcatgctcc ccctaaattg aaatagtgat gtagtaata 149040  
 ttcagaagcg attttctttt gcatttttac ctaaccaagg aaacgggcca cacacctgg 149100  
 tttagggatg ttgtgatagc ttaccttcca gtttttaaga aatgcttctt acaactgctg 149160  
 tcaaccactg tattgtcttt aatgaacact gttgtatccc atcctaattc ttgtactgaa 149220  
 attatttctc atgaaagttt ctctaattt tctaataaaa gtttctctaa tttgggggca 149280  
 taatgtacta agaatcagtt tgctgtatat tagaataaat agtaacagta agtcagcagg 149340  
 attatccaaa caaaagacta ggttttatga gataagcttg atttaagaaa aaaacaatta 149400  
 aagatgaat atcagaaata ctgtgtgttt actctcagat tttagttgggt tggatttaat 149460  
 atcaagataa ctagctgcta agcgtttcat aattctcaca gtgatattag atttcaaaat 149520  
 gacactgaga gaactgaaaa actacatcag tcaaattcat gtatgtatat catatagcct 149580  
 ttaacttttt acattaatca gattcttagt aaaaatgcaga ctgtatacct aaatatttaa 149640  
 atatttactt ttataatctt accttttatt tcaatataaa taaaattctt cttaggttaa 149700  
 aaaattaatt tcagttgtgt ttatgccaga tggcattgct tagttgggtc aagctctcaa 149760  
 tatgtttcat tcttttttat agtctttcac atttataagg aaaagcctta tctccaactg 149820  
 aaacaccagt cttactacta cggtttttaa agttgttaat gatcattatc tattataagg 149880  
 cttttattta catagcaaat tgcttaacat tttattttga atataacaga tttttaaaa 149939

- 5 <210> 3
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 3  
**gcatctttat tatggcagag ag** 22

5  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 4  
**tgctctgaga aaggcatta** 19

15  
 <210> 5  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 5  
**gctgcttcaa agaaagacta aggaaatgga caacagtcaa acaac** 45

25  
 <210> 6  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 6  
**gctttctcac aagcatttgg ttttaaatta gcctgtagt ttacttactc tc** 52

35  
 <210> 7  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

45  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (30)..(30)  
 <223> didesoxi-citosina no extensible

50  
 <400> 7  
**gtctccactg gagtatgtgt ctgtggagac** 30

55  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 8

**gtctccactg gagtatgttt ctgtggagac** 30

5 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> ácido nucleico peptídico (PNA)

<400> 9

**gagtatgtgt ctgtgga** 17

15 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 10

25 **gtcaaacaac aattctttgt act** 23

30 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

35 <400> 11

**agctgtgatc ctgaaactg** 19

40 <210> 12  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

45 <400> 12

**aatatactcc ataatttaa accaaatgct ttctttcttt gaagcagcaa gt** 52

50 <210> 13  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

55 <400> 13

**ttttgtggag acgagagtaa gtaaaactac ataaacaaaa acagatgctc tga** 53

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
**gtgagaaagc tgctcatca t 21**  
 10  
 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 20 <400> 15  
**aggctttcta atgccttc 19**  
 <210> 16  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 30 <400> 16  
**tctatagtc tgcgaaagt aggag 25**  
 <210> 17  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 17  
**aaggcattag aaagcctgta gt 22**  
 45 <210> 18  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 18  
**acaagaatt gttgttgac tgtgtccat tgcatttta ttatggcaga gagaa 55**  
 55 <210> 19  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 19

5 **agtctttctt tgaagcagca agtatgatgt tacttactct cgtctccaca ga 52**

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

15 <400> 20

**agcatttgggt tttaaattat ggagtaggt 30**

**REIVINDICACIONES**

1. Método de detección de la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, comprendiendo el método las etapas de:
- 5
- 1) proporcionar una muestra de ácido nucleico;
- 2) poner en contacto dicha muestra de ácido nucleico, en condiciones de reacción apropiadas, con una disolución que comprende una mezcla de oligonucleótidos y una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra en condiciones de hibridación, en el que dicha mezcla de oligonucleótidos consiste en cebadores adecuados para amplificación isotérmica mediada por bucle de la región de la molécula de ácido nucleico diana que incluye la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse, comprendiendo dichos cebadores:
- 10
- i. un primer cebador externo F3 y un segundo cebador externo B3;
- ii. un primer cebador interno FIP y un segundo cebador interno BIP,
- en el que FIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' F2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' F1c y BIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' B2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' B1c,
- en el que F2 puede reconocer e hibridarse con una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como F2c y B2 puede reconocer e hibridarse con una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como B2c,
- 15
- en el que F2c y B2c son regiones diferentes ubicadas en hebras opuestas de la molécula de ácido nucleico diana,
- en el que o bien B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual o bien F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, y en el que si B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de F2c o en el sentido de 3' de la secuencia de F2c y en el sentido de 5' de la secuencia de F1c, o
- 20
- si F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de B2c o en el sentido de 5' de la secuencia de B2c y en el sentido de 3' de la secuencia de B1c;
- iii. un cebador extensible mutante de tallo-bucle que comprende:
- 40
- una secuencia de bucle central que puede reconocer e hibridarse selectivamente con una región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual, de manera que la secuencia de bucle central puede reconocer e hibridarse con la molécula de ácido nucleico diana sólo si está presente la mutación puntual, y
- 45
- una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3' que son complementarias entre sí de manera que se forma un tallo tras hibridación intramolecular,
- siendo la afinidad de hibridación de la secuencia de bucle central con la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual mayor que la afinidad de hibridación intramolecular de la secuencia en 5' con la secuencia en 3' de manera que, si está presente la mutación puntual, la secuencia de bucle central se aparea con y amplifica la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual;
- 50
- iv. un resto no extensible que puede reconocer e hibridarse selectivamente con las moléculas de ácido nucleico de tipo natural;
- 55
- 3) incubar la mezcla resultante a una temperatura constante;
- 60
- 4) detectar una señal indicativa de amplificación de la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la mutación puntual está ubicada en la región entre la secuencia de F2c y la secuencia de F1c o entre la secuencia de B2c y la secuencia de B1c.
- 65
3. Método según la reivindicación 1, en el que la mutación puntual está ubicada en la secuencia de F2c o en la

secuencia de B2c.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada una de la secuencia de extremo 5' y la secuencia de extremo 3' del cebador extensible mutante de tallo-bucle tiene al menos 3 nucleótidos de longitud.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto no extensible es un ácido nucleico peptídico (PNA).
6. Método según la reivindicación 5, en el que el PNA tiene al menos 10 bases de longitud.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que la secuencia de bases de PNA es tal que la temperatura de fusión de la estructura bicatenaria que resulta de la hibridación del PNA con la molécula de ácido nucleico diana en ausencia de la mutación puntual ( $T_f = X$ ) es mayor que la temperatura de incubación y la temperatura de fusión de la estructura bicatenaria que resulta de la hibridación del PNA con la molécula de ácido nucleico diana en presencia de la mutación puntual ( $T_f = Y$ ) es menor que la temperatura de incubación, y además en el que X es al menos 5°C mayor que Y.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto no extensible es un cebador no extensible de tipo natural de tallo-bucle, que comprende:
- una secuencia de bucle central que puede reconocer e hibridarse selectivamente con una región de la molécula de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse;
  - una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3' que son complementarias entre sí de manera que se forma un tallo tras hibridación intramolecular,
- siendo la afinidad de hibridación de la secuencia de bucle central con la región de la molécula de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse mayor que la afinidad de hibridación intramolecular de la secuencia de extremo 5' con la secuencia de extremo 3', de manera que la secuencia de bucle central se aparea con la región de la molécula de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse, bloqueando de ese modo la amplificación.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la ADN polimerasa se selecciona del grupo que consiste en Bst polimerasa de fragmento grande, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago  $\Phi$ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, fragmento Klenow y cualquier combinación de los mismos.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la mutación puntual que va a detectarse es la mutación  $g \rightarrow t$  en la posición 2343 de SEQ ID NO: 1.
11. Método según la reivindicación 10, en el que el primer cebador externo F3 consiste en SEQ ID NO: 3, el segundo cebador externo B3 consiste en SEQ ID NO: 4, el primer cebador interno FIP consiste en SEQ ID NO: 5, el segundo cebador interno BIP consiste en SEQ ID NO: 6 y el cebador extensible mutante de tallo-bucle consiste en SEQ ID NO: 8.
12. Método según la reivindicación 11, que comprende además un resto no extensible que es un PNA que tiene la siguiente secuencia de bases:  $NH_2$ -GAGTATGTGTCTGTGGA-COOH (SEQ ID NO: 9), en la que G es guanina, A es adenina, T es timina y C es citosina.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además la etapa de evaluar si la mutación puntual está en forma homocigota o heterocigota, comparando cuantitativamente la señal indicativa de amplificación de la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual obtenida a partir de la muestra con dicha señal obtenida a partir de al menos un calibrador.
14. Método según la reivindicación 13, en el que el al menos un calibrador consiste en un porcentaje predeterminado (%) de moléculas de ácido nucleico diana mutantes en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, en el que dicho porcentaje predeterminado (%) es preferiblemente de aproximadamente el 10%.
15. Conjunto de cebadores para detectar, mediante amplificación isotérmica mediada por bucle, la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, comprendiendo el conjunto de cebadores:
- i. un primer cebador externo F3 y un segundo cebador externo B3;

ii. un primer cebador interno FIP y un segundo cebador interno BIP,

5 en el que FIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' F2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' F1c y BIP consiste en una secuencia de ácido nucleico en 3' B2 y una secuencia de ácido nucleico en 5' B1c,

10 en el que F2 es complementaria una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como F2c y B2 es complementaria a una región de la molécula de ácido nucleico diana designada como B2c,

en el que F2c y B2c son regiones no solapantes ubicadas en hebras opuestas de la molécula de ácido nucleico diana,

15 en el que o bien B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual o bien F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, y en el que si B2c está en el sentido de 3' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de F2c o entre la secuencia de F2c y la secuencia de F1c, o

20 si F2c está en el sentido de 5' de la mutación puntual, entonces dicha mutación puntual está ubicada en la secuencia de B2c o entre la secuencia de B2c y la secuencia de B1c;

iii. un cebador extensible mutante de tallo-bucle que comprende:

25 - una secuencia de bucle central complementaria a una región de una molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación puntual, y

- una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3' que son complementarias entre sí de manera que se forma un tallo tras hibridación intramolecular,

30 siendo la afinidad de hibridación de la secuencia de bucle central con la región de la molécula de ácido nucleico diana que comprende la mutación mayor que la afinidad de hibridación intramolecular de la secuencia en 5' con la secuencia en 3'.

35 16. Conjunto de cebadores según la reivindicación 15, en el que cada una de la secuencia de extremo 5' y la secuencia de extremo 3' del cebador extensible mutante de tallo-bucle tiene al menos 3 nucleótidos de longitud.

40 17. Conjunto de cebadores según la reivindicación 15 ó 16, que comprende además un resto no extensible que puede hibridarse con las moléculas de ácido nucleico de tipo natural.

18. Conjunto de cebadores según la reivindicación 17, en el que el resto no extensible es un ácido nucleico peptídico (PNA).

45 19. Conjunto de cebadores según la reivindicación 18, en el que el PNA tiene al menos 10 bases de longitud.

20. Conjunto de cebadores según la reivindicación 15 ó 16, en el que el resto no extensible es un cebador no extensible de tallo-bucle, que comprende:

50 - una secuencia de bucle central complementaria a una región de las moléculas de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse;

- una secuencia de extremo 5' y una secuencia de extremo 3' que son complementarias entre sí de manera que se forma un tallo tras hibridación intramolecular,

55 siendo la afinidad de hibridación de la secuencia de bucle central con la región de las moléculas de ácido nucleico de tipo natural que comprende la posición de ácido nucleico de la mutación puntual que va a detectarse mayor que la afinidad de hibridación intramolecular de la secuencia de extremo 5' con la secuencia de extremo 3'.

60 21. Conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que el primer cebador externo F3 consiste en SEQ ID NO: 3, el segundo cebador externo B3 consiste en SEQ ID NO: 4, el primer cebador interno FIP consiste en SEQ ID NO: 5, el segundo cebador interno BIP consiste en SEQ ID NO: 6 y el cebador extensible mutante de tallo-bucle consiste en SEQ ID NO: 8.

65 22. Conjunto de cebadores según la reivindicación 21, que comprende además un resto no extensible que es un PNA que tiene la siguiente secuencia de bases: NH<sub>2</sub>-GAGTATGTGTCTGTGGA-COOH (SEQ ID NO: 9),

en la que G es guanina, A es adenina, T es timina y C es citosina.

23. Kit para detectar, mediante amplificación isotérmica mediada por bucle, la presencia de una mutación puntual en una molécula de ácido nucleico diana en un contexto de moléculas de ácido nucleico de tipo natural, comprendiendo el kit el conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22 y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra.
24. Kit según la reivindicación 23, en el que la ADN polimerasa se selecciona del grupo que consiste en Bst polimerasa de fragmento grande, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago  $\Phi$ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, fragmento Klenow y cualquier combinación de los mismos.
25. Kit según la reivindicación 23 ó 24, que comprende además uno o más calibradores.

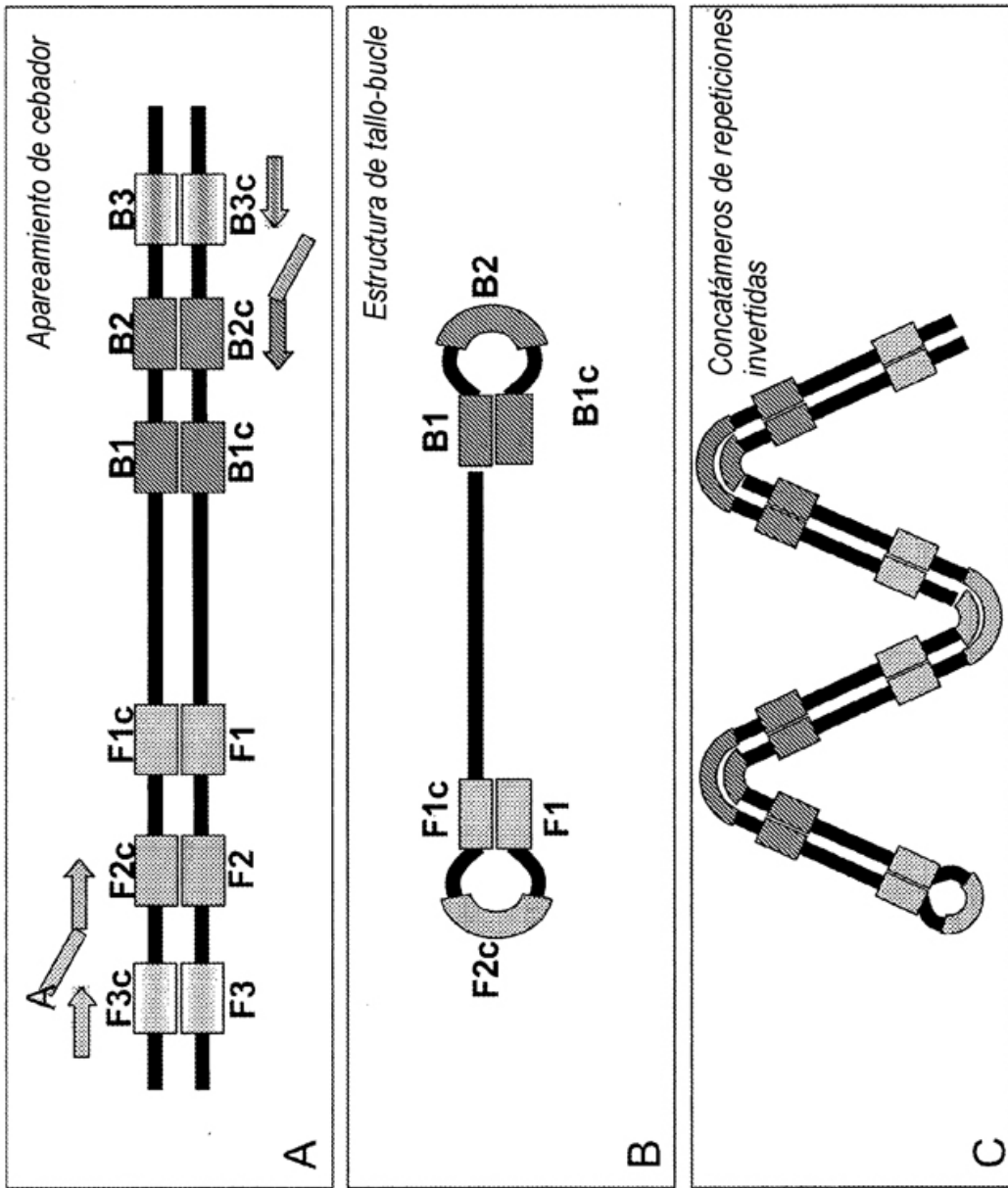


Fig.1

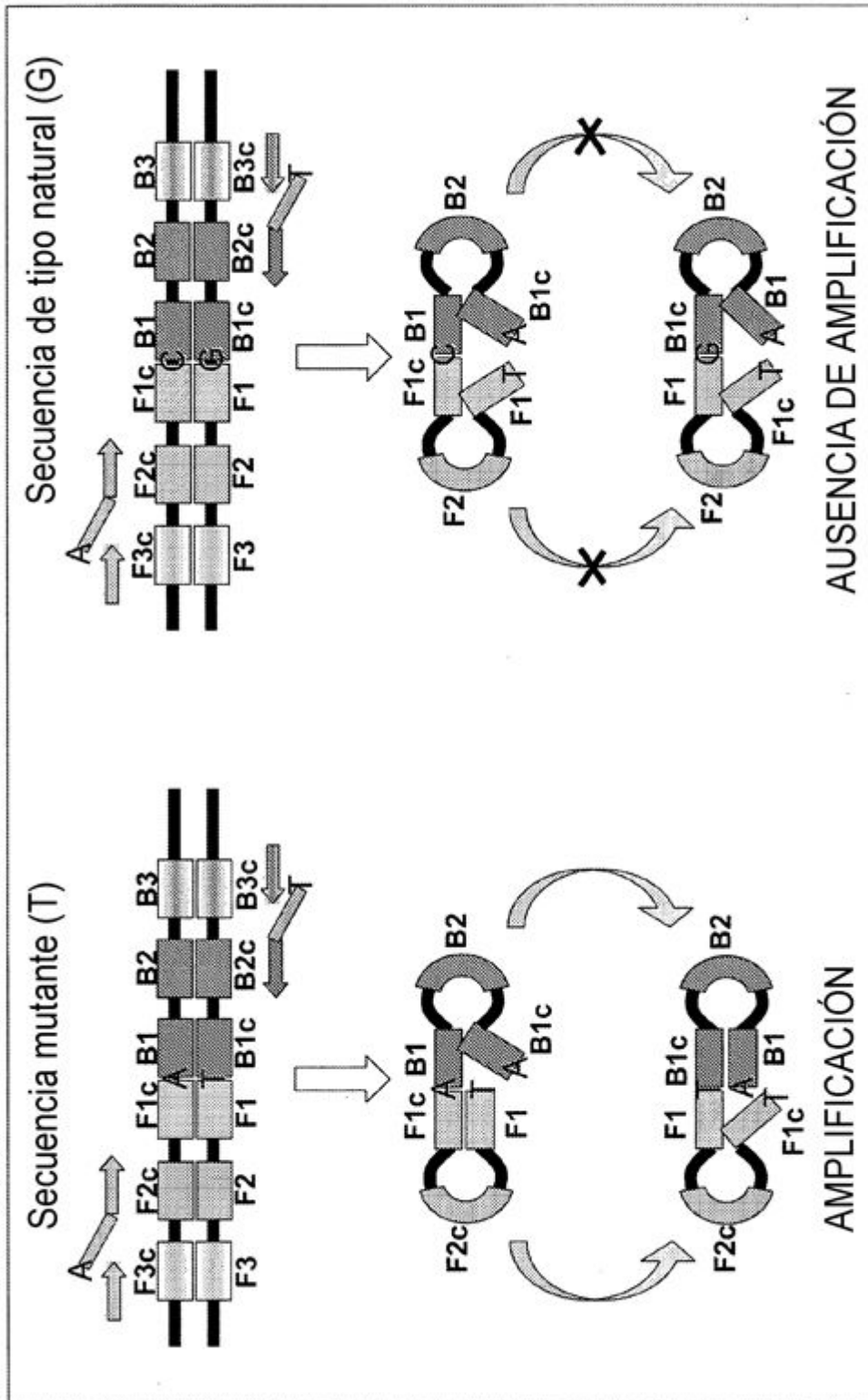


Fig.2

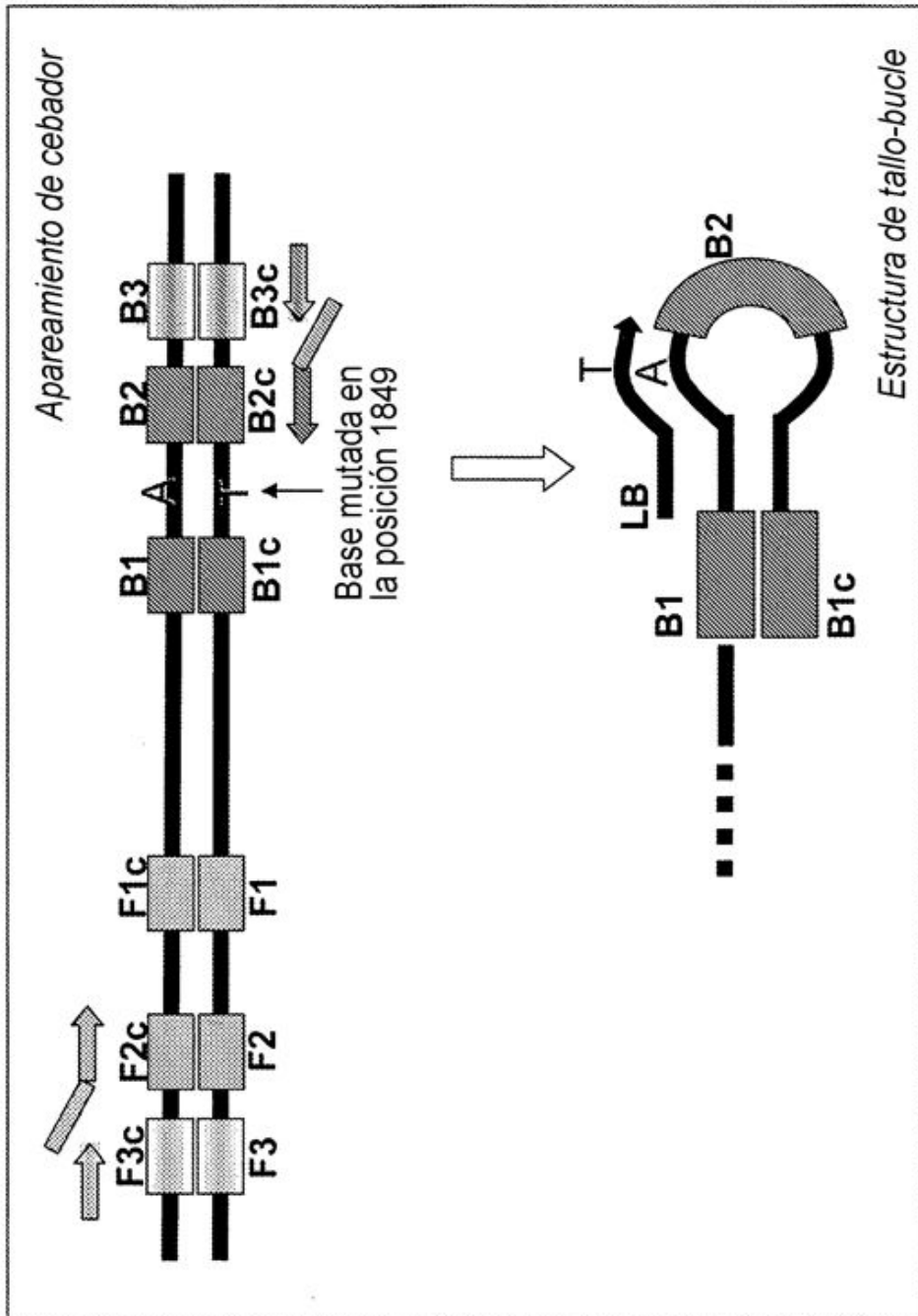


Fig.3

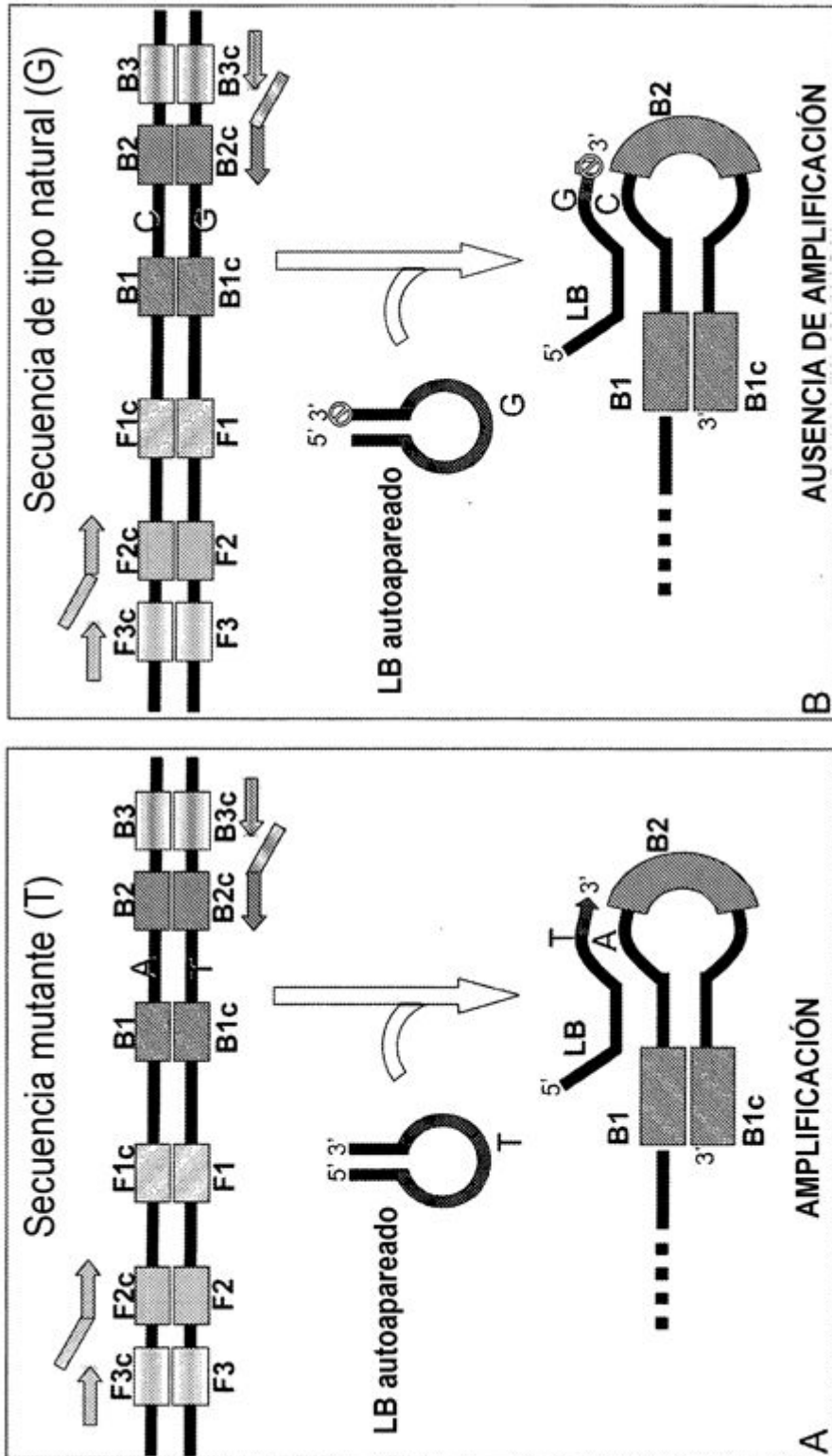


Fig.4

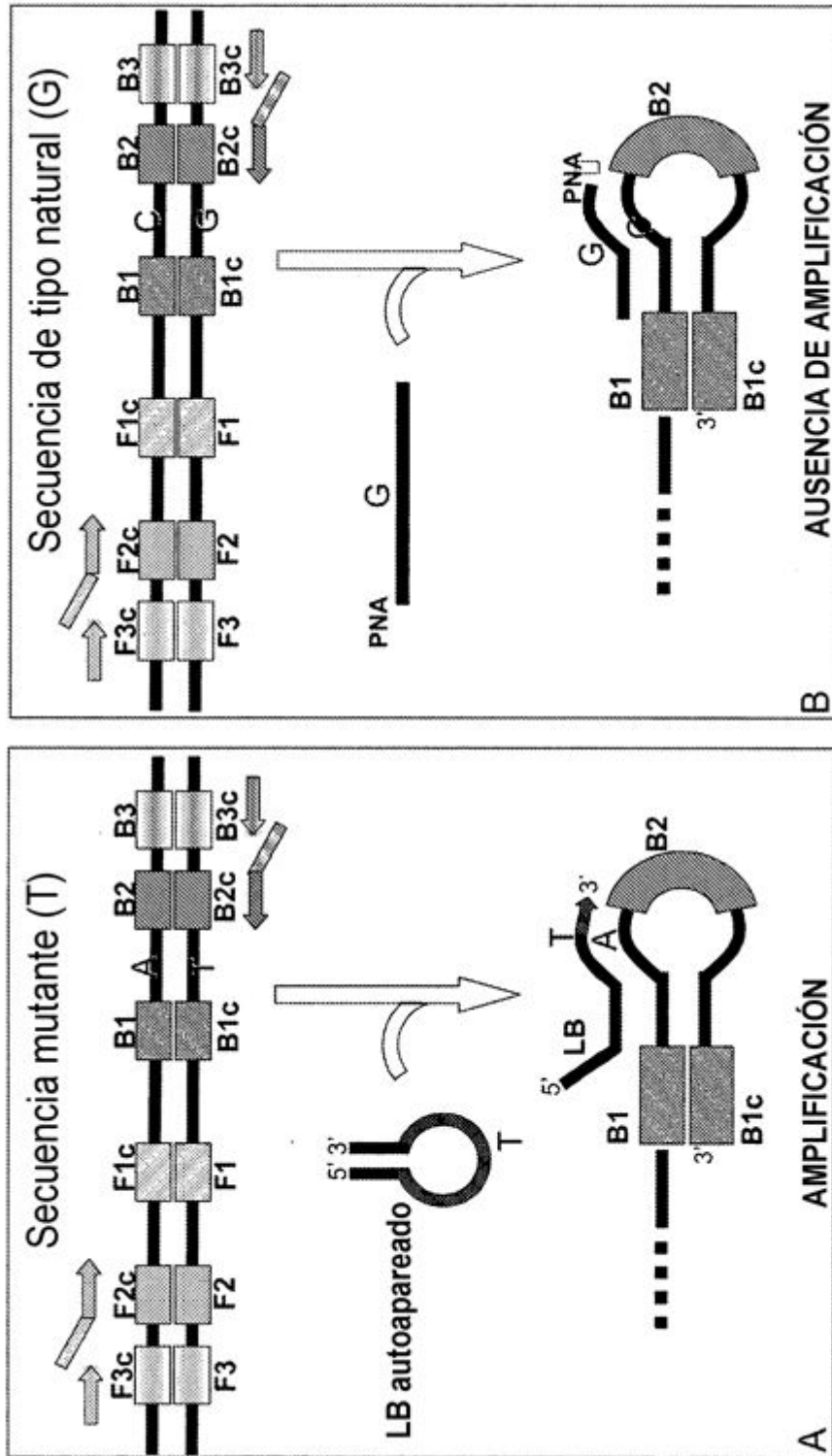


Fig.5

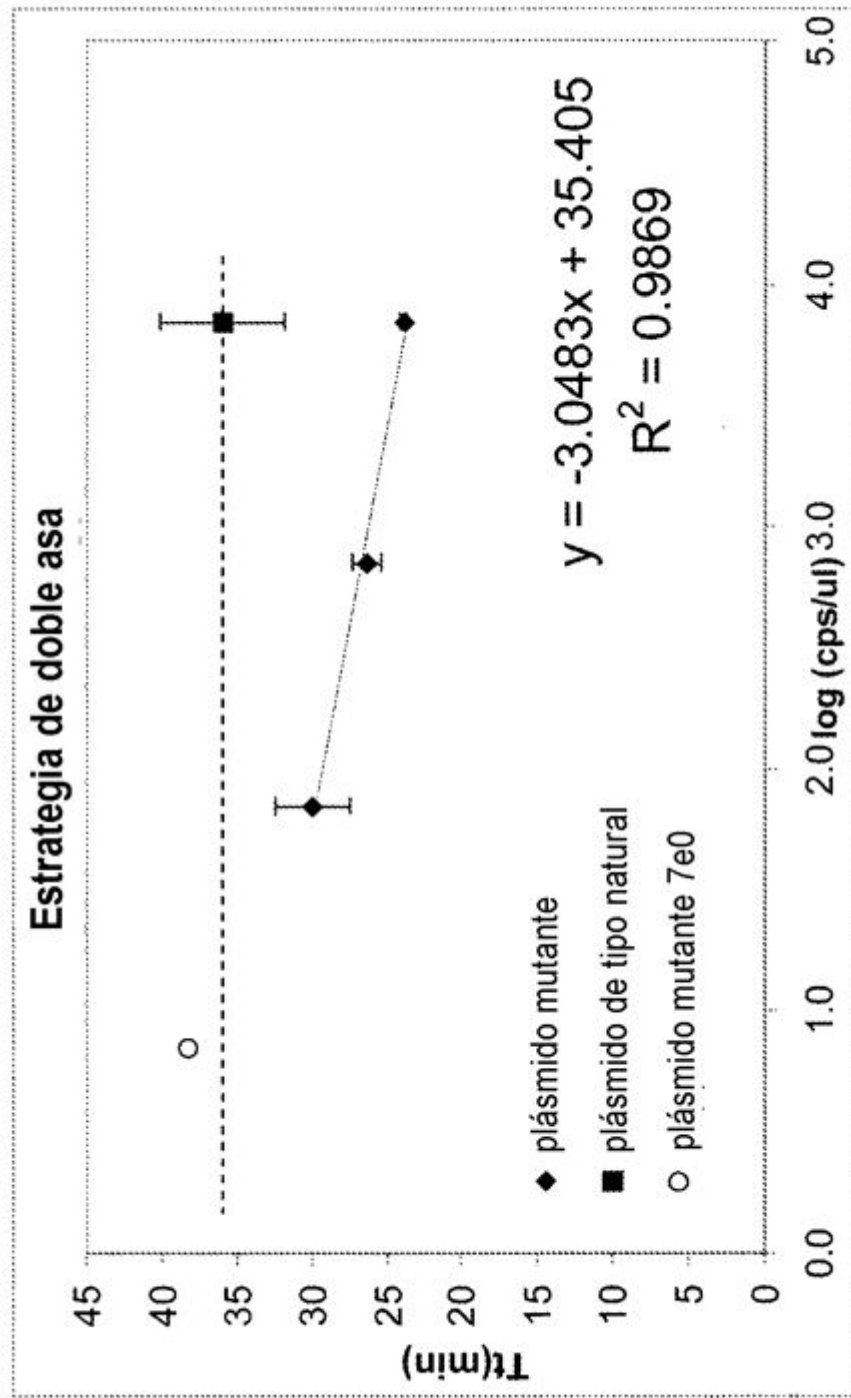


Fig.6

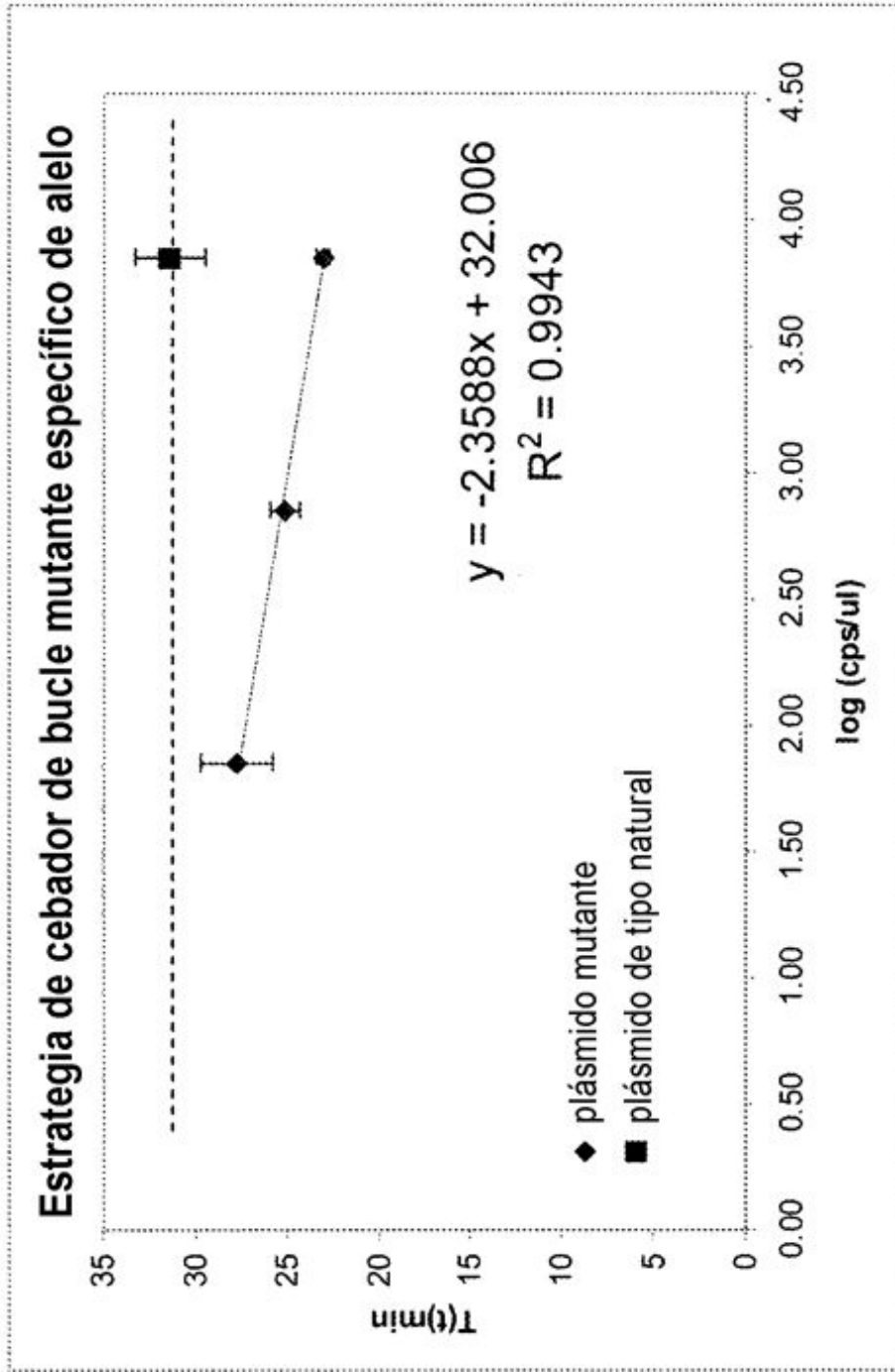


Fig.7

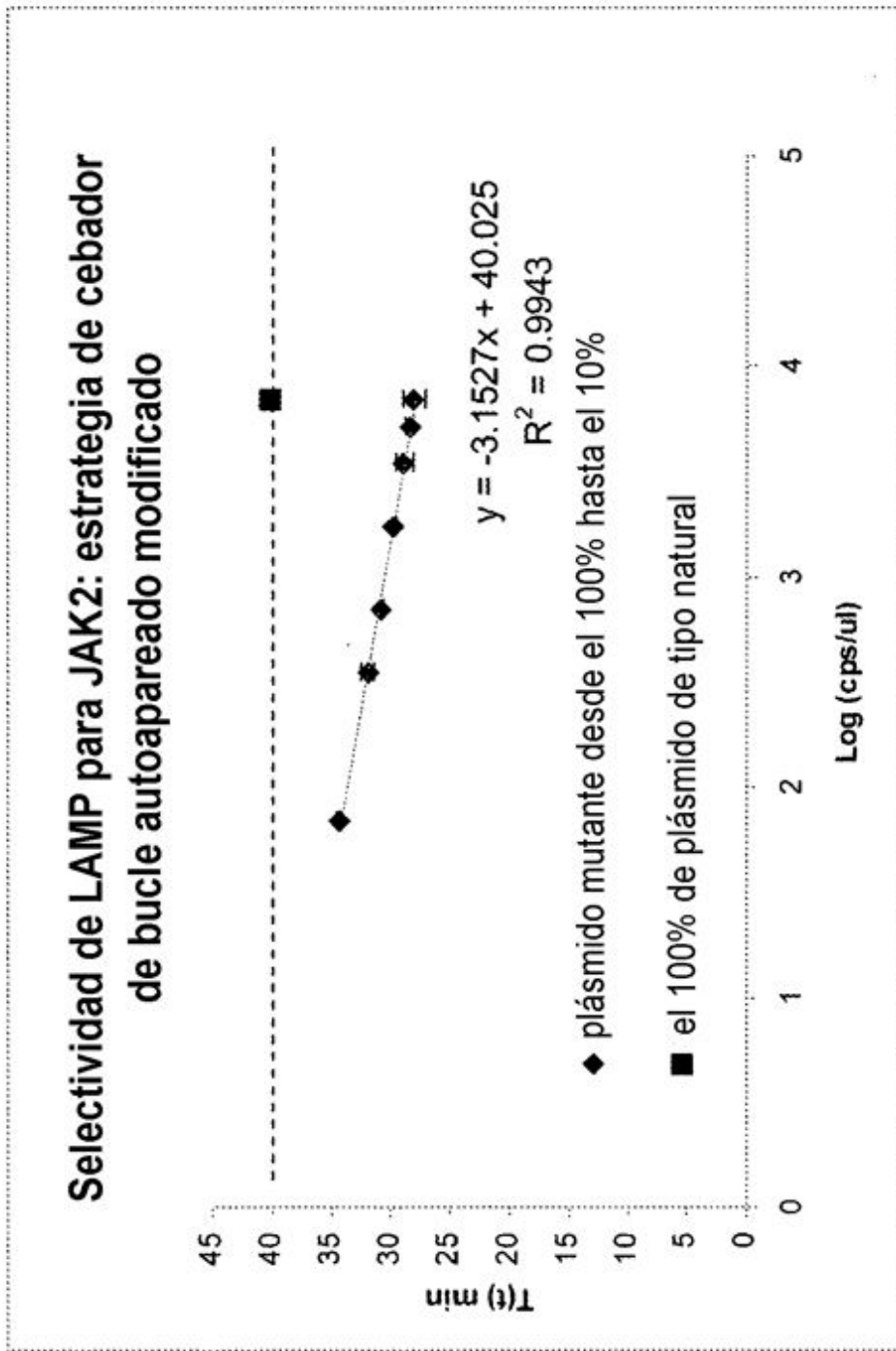


Fig.8

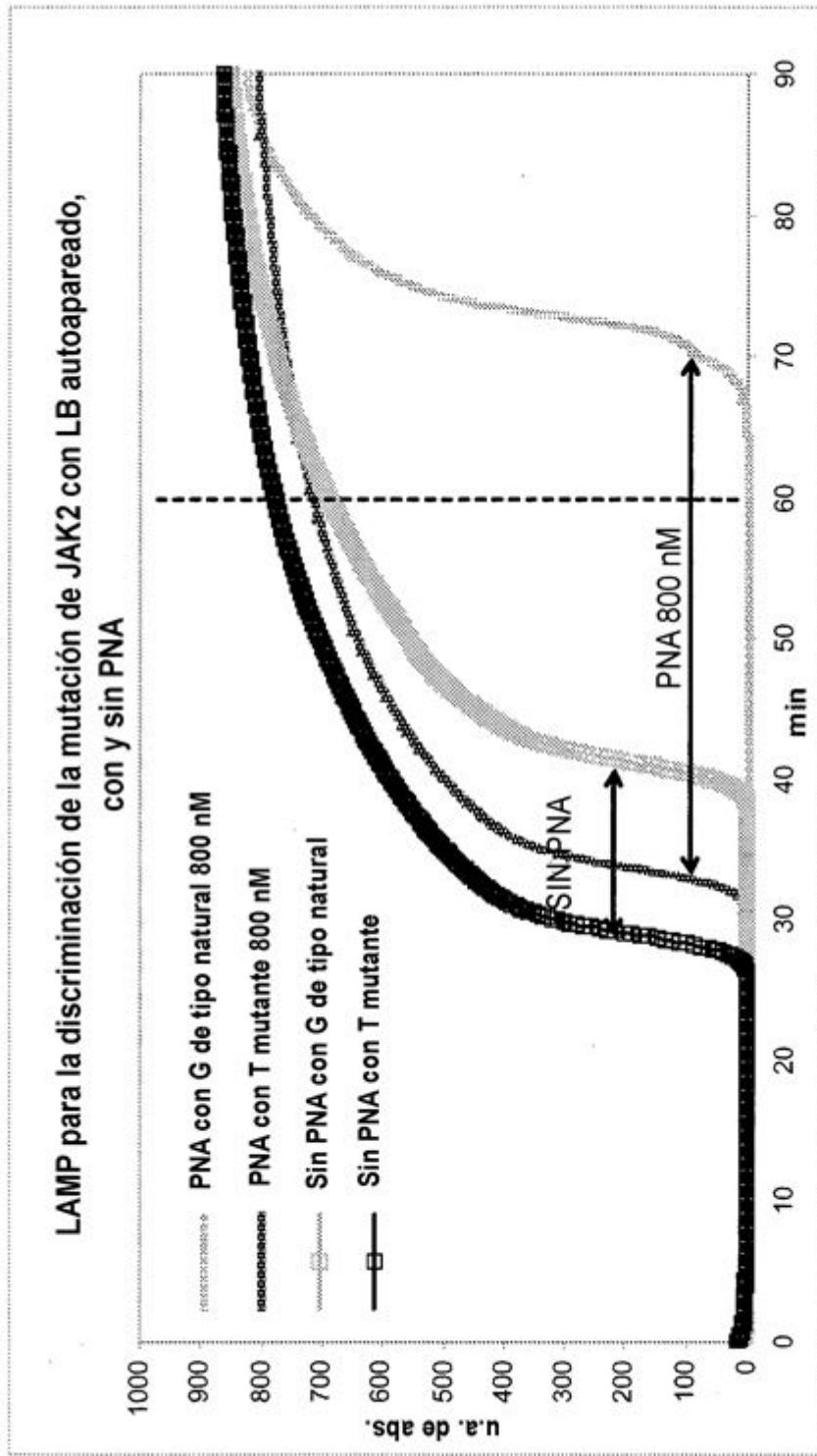


Fig.9

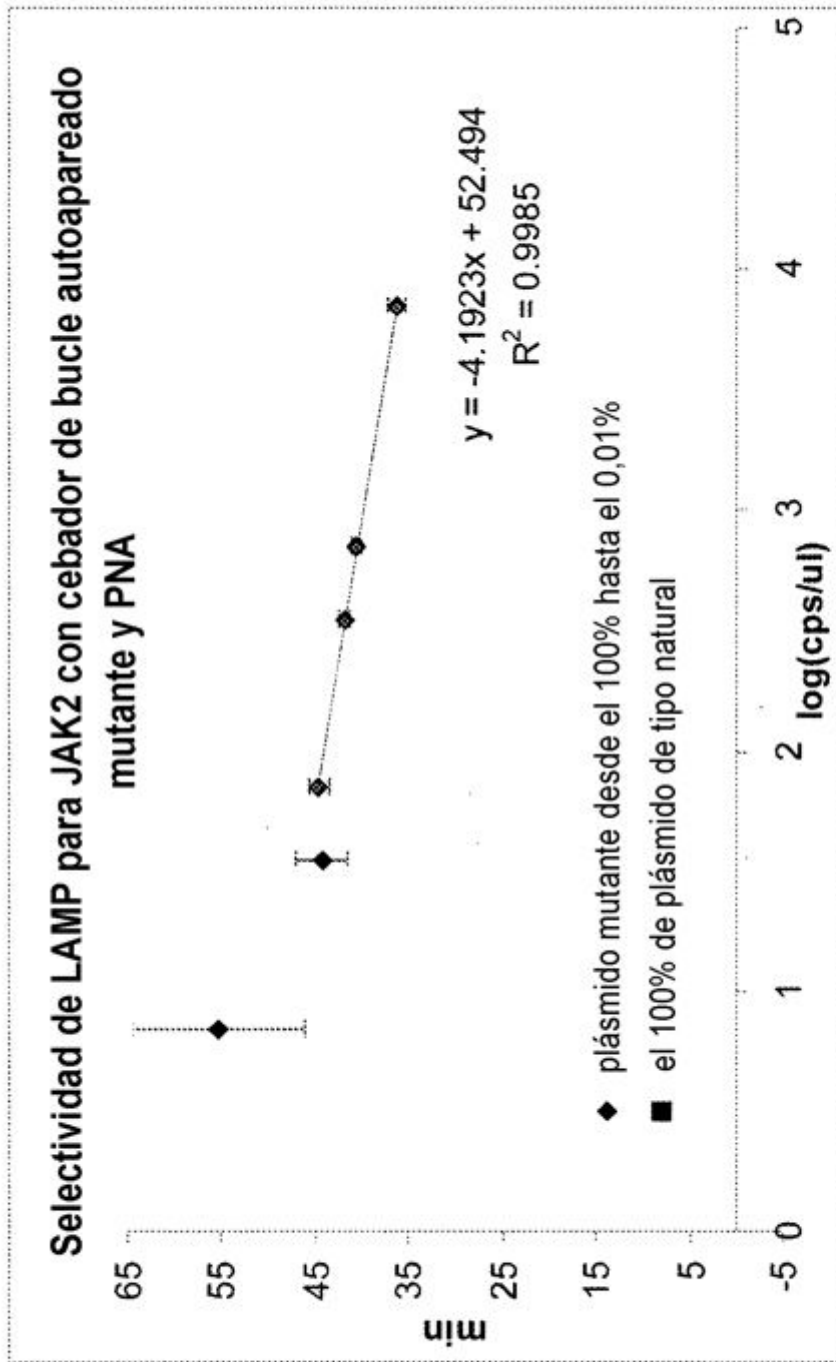


Fig.10

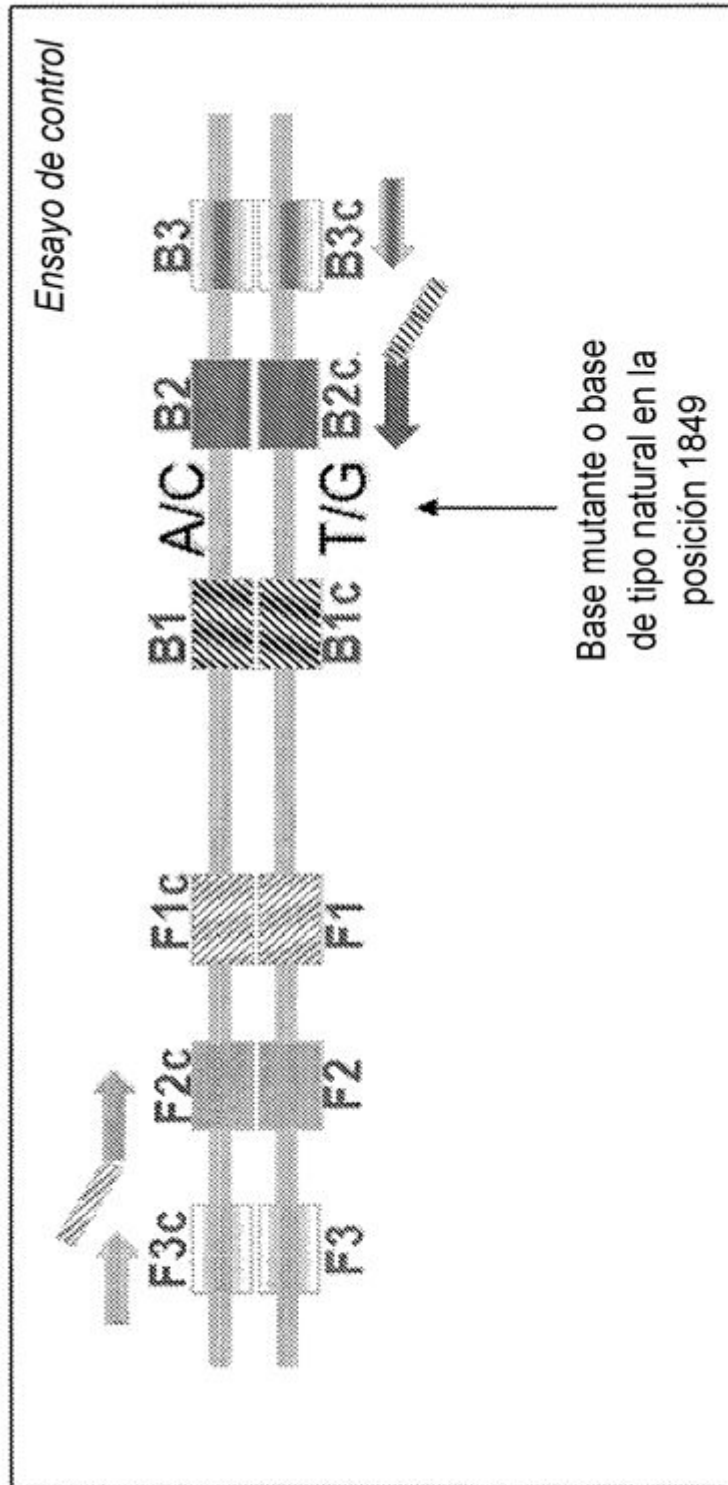


Fig.11

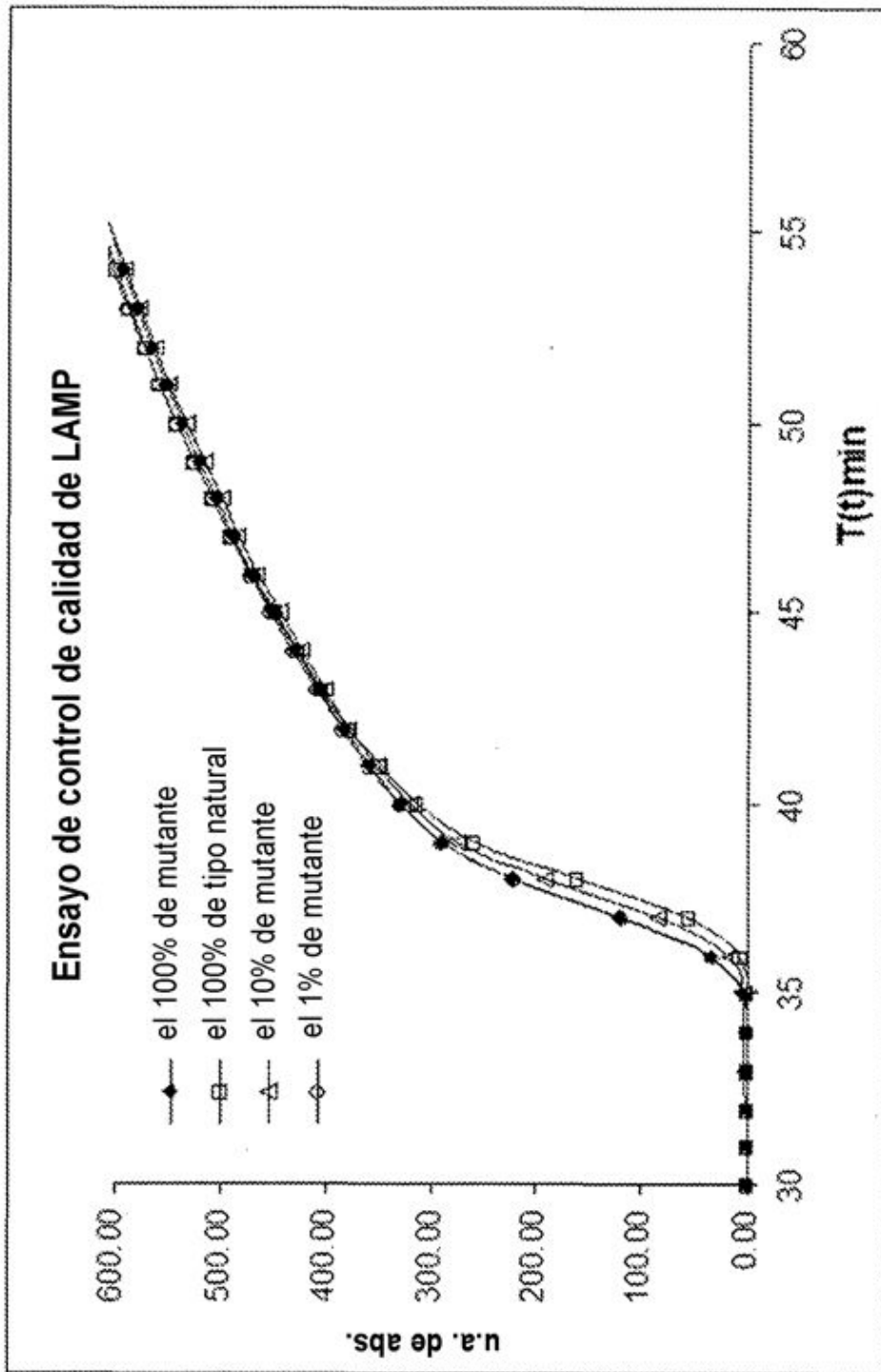


Fig.12

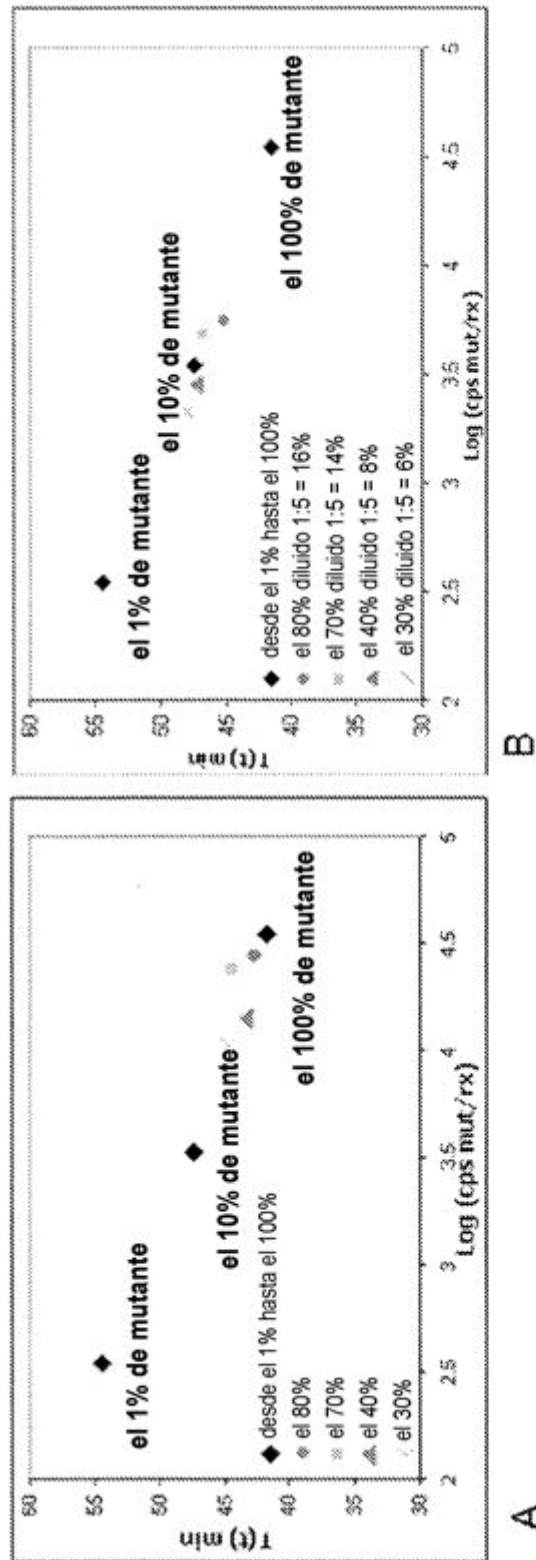


Fig.13

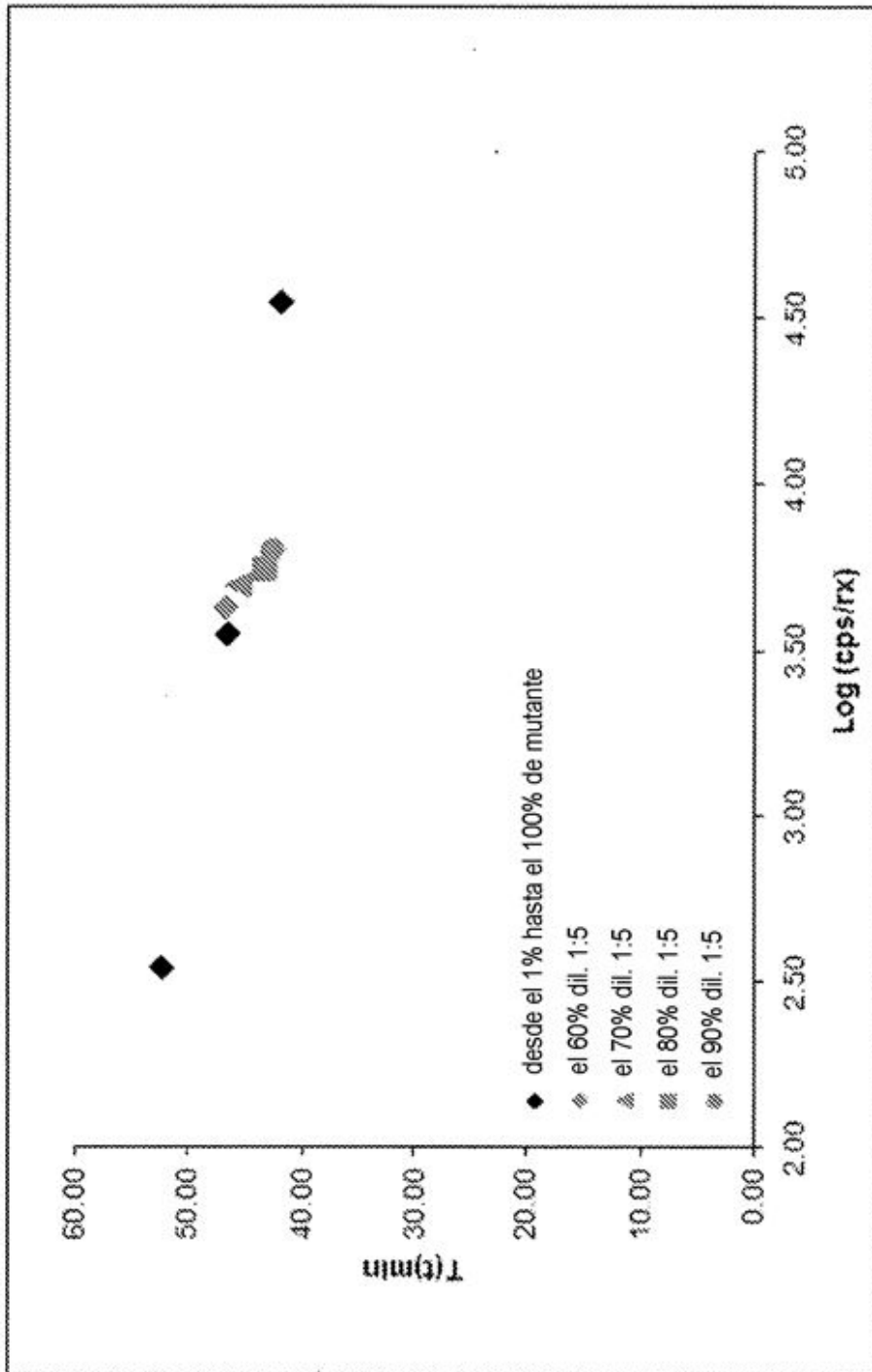


Fig.14

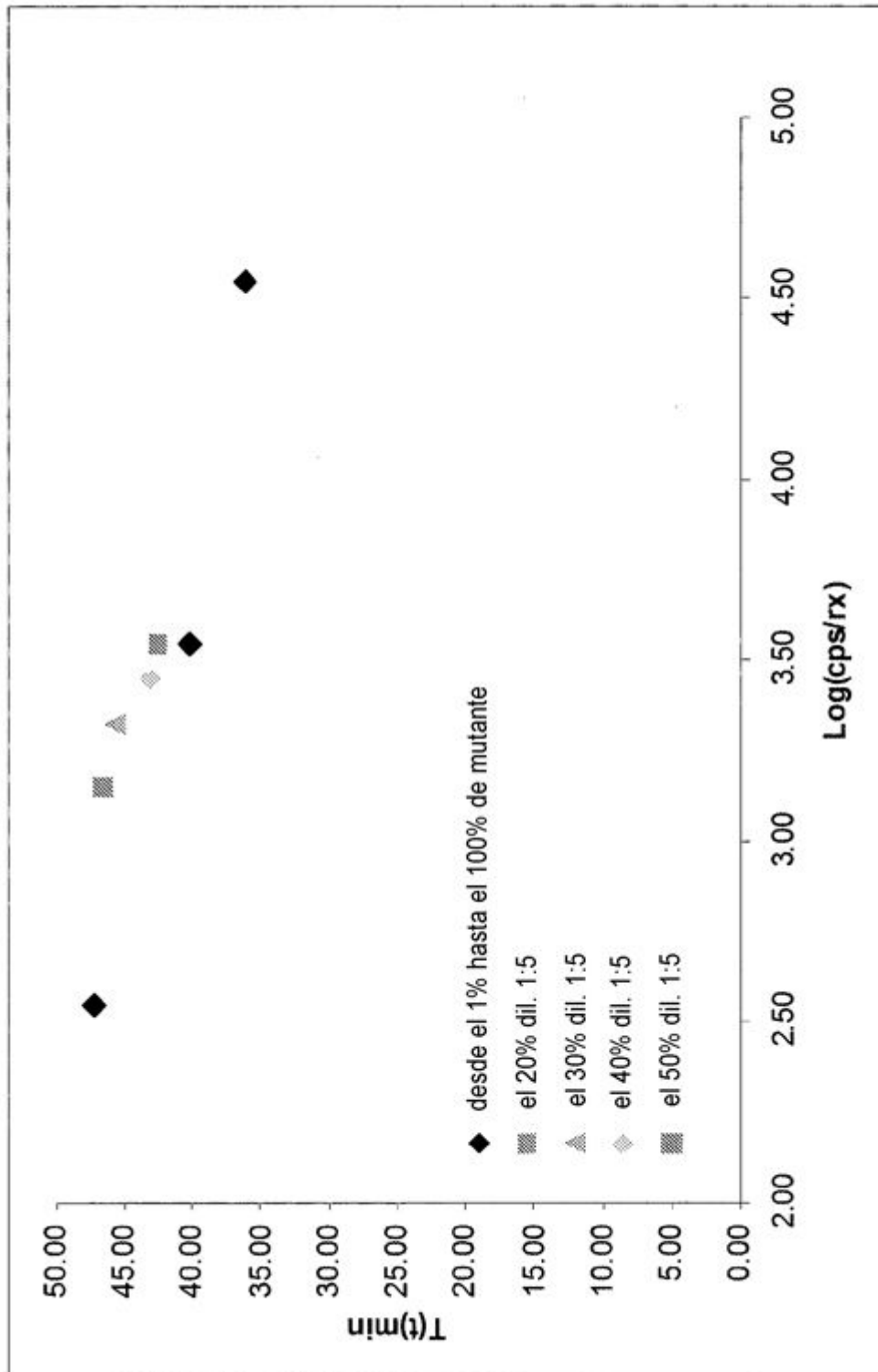


Fig.15