



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 916**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03022242 .6**

(86) Fecha de presentación : **01.10.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1405921**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

(54) Título: **Detección de susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes, especialmente a la diabetes tipo 1.**

(30) Prioridad: **04.10.2002 US 264965**
08.10.2002 US 267844

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Mirel, Daniel B.;**
Erlich, Henry A.;
Bugawan, Teodorica L.;
Noble, Janelle A. y
Valdes, Ana Maria

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 279 916 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

Detección de susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes, especialmente a la diabetes tipo 1.

5 Área de la invención

La presente invención está relacionada con las áreas de la inmunología y la biología molecular. En particular, está relacionada con los métodos y reactivos para la detección del riesgo de un individuo de padecer enfermedades autoinmunes. Más específicamente, está relacionada con los métodos y reactivos para la detección del aumento o
10 reducción del riesgo de un individuo a padecer diabetes tipo 1.

Descripción de la materia relacionada

La respuesta inmunológica a un antígeno está mediada a través de la diferenciación selectiva de células T ayudantes
15 precursoras CD4+ (Th0) a células T ayudantes efectoras tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2), con patrones funcionalmente diferentes de secreción de citoquinas (también descritas como linfoquinas). Las células Th1 secretan interleuquina 2 (IL-2), IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF), linfotóxina (LT) e interferón gamma (IFN- γ) tras su activación, y son principalmente responsables de la inmunidad mediada por células, como la hipersensibilidad de tipo retardado. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 tras su activación, y son principalmente responsables de
20 los mecanismos de defensa extracelular. El papel de las células Th1 y Th2 se revisa en Peltz, 1991, Immunological Reviews, 123: 23-35.

IL-4 e IL-13 tienen un papel central en las reacciones inflamatorias dependientes de IgE.

25 La IL-4 induce la producción de anticuerpos IgE por las células B y, además, proporciona una función de regulación de la diferenciación de Th0 a células efectoras Th1 o Th2 tanto mediante la promoción de la diferenciación a células Th2 como con la inhibición de la diferenciación a células Th1. La IL-13 también induce la producción de anticuerpos IgE por las células B.

30 Se ha asociado un SNP en la región del promotor de la IL-4 con la diabetes tipo 1 (Ohkubo *et al.*, Diabetologia, vol. 44, supl. 1, pág. 80a, 2001).

IL-4 e IL-13 operan a través del receptor de IL-4 ("IL4R"), que se encuentra tanto en células B como T, y del IL13R, que se encuentra en células B, respectivamente. El receptor de IL-4 humano (IL4R) es un heterodímero que
35 comprende la cadena α de IL4R y la cadena γ del receptor de IL-2. La cadena α del receptor IL-4 también funciona como cadena α del receptor de IL-13. IL-4 se une tanto al IL4R como al IL13R a través de la cadena α del IL4R y puede activar tanto las células B como las T, mientras que la IL-13 se une sólo al IL13R a través de la cadena $\alpha 1$ del IL13R y activa sólo las células T. Algunos SNP del IL4R se han asociado con la diabetes tipo 1 (Bugawan *et al.*, American Journal of Human Genetics, Vol. 69, n° 4, suplemento, pág. 403, 2001).

40 Resumen de la invención

La presente invención proporciona los métodos para la detección de un aumento o reducción del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1, también conocida como diabetes mellitus insulino-dependiente ("DMID"). La presente invención también proporciona los equipos, reactivos y chips útiles para
45 la detección del riesgo de un individuo de padecer enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1.

La presente invención proporciona un método para la detección del aumento o reducción del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad autoinmune, como la diabetes tipo 1, mediante la detección de la presencia de un polimorfismo asociado a la diabetes tipo 1 en el locus de IL-13 en una muestra de ácido nucleico de un individuo, en el que la
50 presencia de dicho polimorfismo indica el aumento del riesgo de un individuo de sufrir diabetes tipo 1.

En una realización, se detectan un polimorfismo del IL4R y un polimorfismo de IL-13. En otra realización, se detectan un polimorfismo de IL-4 y un polimorfismo de IL-13. En otra realización, se detectan un polimorfismo del
55 IL4R, un polimorfismo de IL-4 y un polimorfismo de IL-13. El polimorfismo de IL-13 se selecciona de entre los polimorfismos de IL-13 que se listan en la Tabla 21. El individuo puede pertenecer a cualquier raza o población. En una realización, el individuo es un asiático, preferiblemente un filipino, o un caucásico.

La muestra de ácido nucleico puede obtenerse a partir de cualquier parte del cuerpo del individuo, lo que incluye, pero no se limita al pelo, piel, uñas, tejidos o fluidos corporales como la saliva, sangre, etc. La muestra de ácido nucleico puede, pero no necesita, amplificarse mediante ningún método de amplificación, lo que incluye, pero no se limita a la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). En una realización, el polimorfismo puede ser un polimorfismo de un único nucleótido ("SNP") en el locus de IL-13.

65 En otra realización, haplotipos específicos en los locus de IL4R, IL-4 e IL-13 así como combinaciones específicas e interacciones entre SNP en esos locus pueden ser indicativos de un aumento o reducción del riesgo de padecer una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1.

El polimorfismo puede detectarse mediante cualquier método conocido en la materia para la detección de la presencia de un polimorfismo específico en una muestra de ácido nucleico. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a poner en contacto la muestra de ácido nucleico con una o más moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones de hibridación astringentes con al menos un polimorfismo del IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1, y la detección de la hibridación, la detección mediante la amplificación de la muestra de ácido nucleico mediante, por ejemplo, PCR, y mediante secuenciación directa de la muestra de ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención está relacionado con un equipo útil para la detección la presencia de un polimorfismo que predispone o protege en el locus del IL4R, IL-4 o IL-13, en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer diabetes tipo 1 se está valorando. El equipo puede comprender uno o más oligonucleótidos capaces de detectar un polimorfismo que predispone o que protege en el locus del IL4R, IL-4 o IL-13 así como las instrucciones para la utilización del equipo para la detección de susceptibilidad de padecer una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1. En realizaciones preferibles, el oligonucleótido o oligonucleótidos comprenden individualmente una secuencia que hibrida bajo condiciones de hibridación astringentes con al menos un polimorfismo del IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1. En algunas realizaciones, el oligonucleótido u oligonucleótidos comprenden individualmente una secuencia que es totalmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo del IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1.

El equipo de la presente invención comprende:

(a) uno o más oligonucleótidos específicos de secuencia que individualmente comprenden una secuencia que hibrida bajo condiciones astringentes con el *alelo variante* del polimorfismo de IL-13 asociado con la diabetes tipo 1, A(-1512)C o C(-1112)T, como se lista en la Tabla 2; y

(b) las instrucciones para la utilización del equipo en la determinación del riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido puede utilizarse para detectar la presencia de un polimorfismo del IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1 mediante la hibridación al polimorfismo bajo condiciones de hibridación astringentes. En algunas realizaciones, el oligonucleótido puede utilizarse como un cebador de extensión en una reacción de amplificación como la PCR o en una reacción de secuenciación, en la que el polimorfismo del IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1 se detecta mediante amplificación o mediante secuenciación.

En ciertas realizaciones, el equipo puede comprender también cebadores de amplificación o secuenciación que pueden ser, aunque no es necesario, específicos de secuencia. El equipo también puede comprender reactivos para el marcaje de uno o más de los oligonucleótidos, o comprende oligonucleótidos marcados. Opcionalmente, el equipo puede comprender reactivos para detectar el marcaje.

En algunas realizaciones, el equipo puede comprender uno o más oligonucleótidos que pueden utilizarse para detectar la presencia de dos o más polimorfismos del IL4R, IL-4 o IL-13 que predisponen o que protegen, o combinaciones de polimorfismos que predisponen, de polimorfismos que protegen o de ambos.

En otro aspecto, la invención proporciona un chip útil para la detección de la presencia de un polimorfismo de IL4R, IL-4 o IL-13 que predispone o que protege en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer diabetes tipo 1 se está valorando. El chip puede comprender uno o más oligonucleótidos capaces de detectar un polimorfismo de IL4R, IL-4 o IL-13 que predispone o que protege. Los oligonucleótidos pueden estar inmovilizados sobre un sustrato, por ejemplo, una membrana o vidrio.

En realizaciones preferibles, el oligonucleótido u oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que puede hibridar bajo condiciones de hibridación astringentes con una secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo de IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1. En algunas realizaciones, el oligonucleótido u oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que es totalmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo de IL4R, IL-4 o IL-13 asociado a la diabetes tipo 1. El oligonucleótido u oligonucleótidos pueden estar marcados, aunque no es necesario. En algunas realizaciones, el chip puede ser un microchip.

En algunas realizaciones, el chip puede comprender uno o más oligonucleótidos utilizados para detectar la presencia de dos o más polimorfismos de IL4R, IL-4 o IL-13 que predisponen o que protegen, o combinaciones de polimorfismos que predisponen, de polimorfismos que protegen o de ambos.

En ciertas realizaciones, el riesgo de un individuo de padecer enfermedades concretas mediadas por las Th1 se diagnostica a partir del genotipo de IL4R, IL-4 o IL-13 del individuo. En una realización preferida, la enfermedad mediada por las Th1 es la diabetes tipo 1. Un individuo que presenta al menos un polimorfismo estadísticamente asociado con la diabetes tipo 1 posee un factor que contribuye al aumento o la reducción del riesgo de padecer diabetes tipo 1 comparado con un individuo sin el polimorfismo. La asociación estadística de los polimorfismos de IL4R, IL-4 o IL-13 (variantes de secuencia) se muestra en los ejemplos.

El genotipo puede determinarse utilizando cualquier método capaz de identificar variaciones de nucleótidos que consisten en lugares polimórficos de un único nucleótido. El método particular utilizado no es un aspecto crítico de la invención. A continuación se describen una serie de métodos adecuados.

En una realización de la invención, la genotipificación se realiza utilizando sondas de oligonucleótidos específicas de las secuencias variantes de IL4R, IL-4 o IL-13. Preferiblemente, una región de los genes del IL4R, IL-4 o IL-13 que incluye uno o varios puntos polimórficos de interés se amplifica previamente, o de forma concurrente, con la hibridación de sondas dirigidas a estos puntos. Los ensayos basados en sondas para la detección de variantes de secuencia son bien conocidos en la materia.

Alternativamente, la genotipificación se realiza utilizando reacciones de amplificación específicas de alelo o de extensión, en las que se utilizan cebadores específicos de alelo que permiten la extensión del cebador sólo si el alelo diana está presente. Normalmente, un cebador específico de alelo hibrida con los genes del IL4R, IL-4 o IL-13 de forma que el nucleótido terminal en 3' se alinea con una posición polimórfica. Las reacciones de amplificación específicas de alelo y las reacciones de extensión específicas de alelo son bien conocidas en la materia.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 proporciona un esquema de un método de haplotipificación molecular;

La Fig. 2 proporciona una ilustración de la epistasis entre los SNP del IL4R y los SNP de IL-4 e IL-13.

Breve descripción de las tablas

La Tabla 1 proporciona la secuencia de nucleótidos de la región codificante del IL4R (ID. de SEC. N°: 2);

La Tabla 2 proporciona los SNP de IL4R, IL-4 e IL-13 útiles en los métodos de la invención;

La Tabla 3 proporciona las sondas utilizadas para identificar los polimorfismos del IL4R (ID. de SEC. N°: 3-19);

La Tabla 4 proporciona las frecuencias estimadas informáticamente del haplotipo, comparando filipinos control y diabéticos (ID. de SEC. N°: 20-24);

La Tabla 5 proporciona los genotipos de individuos afectados y no afectados;

La Tabla 6 proporciona los polimorfismos de un único nucleótido detectados;

La Tabla 7 proporciona los cebadores y longitud de los amplicones (ID. de SEC. N°: 25-36);

La Tabla 8 proporciona las sondas de hibridación y los títulos (ID. de SEC. N°: 37-53);

La Tabla 9 proporciona la frecuencia alélica del alelo salvaje en los fundadores del HBDI;

La Tabla 10 proporciona los valores D' y D para los pares de SNP de IL4R;

La Tabla 11A proporciona los resultados del análisis PTD de locus único;

La Tabla 11B proporciona los resultados del análisis PTD de locus único;

La Tabla 12 proporciona los cebadores para la PCR específica de alelo (ID. de SEC. N°: 54-62);

La Tabla 13 proporciona las distribuciones de IPD de los haplotipos de IL4R;

La Tabla 14A proporciona las transmisiones de haplotipo;

La Tabla 14B proporciona las transmisiones de haplotipo;

La Tabla 14C proporciona las transmisiones de haplotipo;

La Tabla 15A proporciona las transmisiones de haplotipo SNP por SNP;

La Tabla 15B proporciona las transmisiones de haplotipo SNP por SNP;

La Tabla 16A proporciona un análisis PTD;

La Tabla 16B proporciona un análisis PTD;

La Tabla 16C proporciona un análisis PTD;

ES 2 279 916 T3

La Tabla 17A proporciona un análisis PTD;

La Tabla 17B proporciona un análisis PTD;

La Tabla 18 proporciona las frecuencias alélicas en filipinos control y diabéticos;

La Tabla 19 proporciona las frecuencias estimadas de los haplotipos;

La Tabla 20 proporciona las frecuencias observadas de los haplotipos;

La Tabla 21 proporciona las frecuencias alélicas en diabéticos y controles;

La Tabla 22 proporciona los valores de desequilibrio de ligamiento por pares de los SNP de IL4R;

La Tabla 23 proporciona los valores de desequilibrio de ligamiento por pares de los SNP de IL-4 e IL-13;

La Tabla 24 proporciona las frecuencias de los genotipos en pacientes y controles;

La Tabla 25A proporciona los haplotipos de 7 SNP de IL4R en filipinos diabéticos y controles;

La Tabla 25B proporciona las frecuencias estimadas de los haplotipos de 10 SNP de IL4R en diabéticos y controles;

La Tabla 26 proporciona las frecuencias estimadas de los haplotipos de 5 SNP de IL-4 e IL-13 en diabéticos y controles;

La Tabla 27 proporciona la correlación entre las frecuencias de los genotipos en los SNP de IL4R y cinco SNP de IL-4 e IL-13;

La Tabla 28 proporciona la interacción epistática entre los SNP de IL4R y cinco SNP de IL-4 e IL-13;

La Tabla 29 proporciona las sondas utilizadas para identificar los polimorfismos de IL-4 e IL-13 (ID. de SEC. N°: 63-68);

La Tabla 30 proporciona los cebadores y la longitud de los amplicones para un promotor de IL-4 y SNP de IL-13 (ID. de SEC. N°: 69-74);

La Tabla 31 proporciona los cebadores y la longitud de los amplicones para los SNP del promotor de IL4R (ID. de SEC. N°: 75-80);

La Tabla 32 proporciona los cebadores y la longitud de los amplicones para los SNP del promotor de IL-13 (ID. de SEC. N°: 81-86)

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona los métodos, reactivos y equipos para la detección de un aumento o reducción del riesgo de un individuo de padecer la enfermedad autoinmune diabetes tipo 1.

Abreviaturas y terminología

El término “*gen del IL4R*” o “*locus del IL4R*” se refiere a la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica la subunidad alfa de la proteína del receptor de la interleuquina 4. La secuencia de nucleótidos de un gen, como se utiliza aquí, incluye las regiones codificantes, denominadas exones, las regiones no codificantes intercaladas, denominadas intrones, y las regiones anteriores y posteriores. Las regiones anteriores y posteriores pueden incluir regiones del gen que se transcriben que no forman parte de un intrón o exón, o regiones del gen que comprenden, por ejemplo, los sitios de unión de factores que modulan la transcripción del gen. La secuencia génica de un mRNA humano de IL4R se proporciona en GenBank con el número de acceso X52425.1 (ID. de SEC. N°: 1). La región codificante se proporciona con el ID. de SEC. N°: 2. La secuencia de genómico del gen del IL4R está incluida en GenBank con el número de acceso AC004525.1 (ID. de SEC. N°: 88).

El término “*gen de la IL-4*” o “*locus de la IL-4*” se refiere a la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica la proteína interleuquina 4. La secuencia de nucleótidos de un gen, como se utiliza aquí, incluye las regiones codificantes, denominadas exones, las regiones no codificantes intercaladas, denominadas intrones, y las regiones anteriores y posteriores. Las regiones anteriores y posteriores pueden incluir regiones del gen que se transcriben que no forman parte de un intrón o exón, o regiones del gen que comprenden, por ejemplo, los sitios de unión de factores que modulan la transcripción del gen. La secuencia de genómico del gen de la IL-4 se proporciona en GenBank con el número de acceso M23442.1 (ID. de SEC. N°: 89).

El término “*gen de la IL-13*” o “*locus de la IL-13*” se refiere a la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica la proteína interleuquina 13. La secuencia de nucleótidos de un gen, como se utiliza aquí, incluye las regiones codificantes, denominadas exones, las regiones no codificantes intercaladas, denominadas intrones, y las regiones anteriores y posteriores. Las regiones anteriores y posteriores pueden incluir regiones del gen que se transcriben que no forman parte de un intrón o exón, o regiones del gen que comprenden, por ejemplo, los sitios de unión de factores que modulan la transcripción del gen. La secuencia de genómico del gen de la IL-13 se proporciona en GenBank con el número de acceso U10307.1 (ID. de SEC. N°: 90).

El término “*alelo*”, como se utiliza aquí, se refiere a una variante de la secuencia del gen. Los alelos se identifican respecto a una o más posiciones polimórficas, sin especificar el resto de la secuencia génica. Por ejemplo, un alelo del IL4R puede definirse mediante el nucleótido presente en un único SNP, o mediante los nucleótidos presentes en una serie de SNP. En ciertas realizaciones de la invención, un IL4R se define mediante los genotipos de 6, 7, 8 o 10 SNP de IL4R. Ejemplos de tales SNP de IL4R se proporcionan en la Tabla 2, a continuación.

Convenientemente, el alelo presente con una mayor frecuencia en la población se denominará el alelo salvaje; el(los) alelo(s) menos frecuentes se denominará(n) alelo(s) mutante(s). Esta denominación de un alelo como mutante únicamente pretende distinguir el alelo del alelo salvaje y no pretende indicar un cambio o pérdida de función.

El término “*polimorfismo que predispone*” se refiere a un polimorfismo que se asocia positivamente con una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1. La presencia de un polimorfismo que predispone en un individuo podría ser indicativa de que el individuo tiene un riesgo aumentado de padecer la enfermedad en relación con un individuo sin el polimorfismo.

El término “*polimorfismo que protege*” se refiere a un polimorfismo que se asocia negativamente con una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1. La presencia de un polimorfismo que protege en un individuo podría ser indicativa de que el individuo tiene un riesgo reducido de padecer la enfermedad en relación con un individuo sin el polimorfismo.

Los términos “*polimórfico*” y “*polimorfismo*”, como se utilizan aquí, se refieren a la condición en la que dos o más variantes de una secuencia de genómico específica, o la secuencia de aminoácidos codificada, pueden encontrarse en una población. Los términos se refieren a la secuencia de ácido nucleico o a la secuencia de aminoácidos codificada; su utilización estará clarificada por el contexto. La región polimórfica o lugar polimórfico se refiere a una región del ácido nucleico en el que aparece la diferencia de nucleótido que distingue las variantes, o, para secuencias de aminoácido, una región de la secuencia de aminoácido en la que aparece la diferencia de aminoácido que distingue las variantes de proteína. Como se utiliza aquí, un “polimorfismo de un único nucleótido”, o SNP, se refiere a un lugar polimórfico que consiste en una posición de un único nucleótido.

El “*cociente de probabilidad*” (“CP”) se refiere a la proporción entre la probabilidad de padecer la enfermedad de los individuos con el marcador (alelo o polimorfismo) y la probabilidad de padecer la enfermedad de los individuos sin el marcador (alelo o polimorfismo).

El “*desequilibrio de ligamiento*” (“DL”) se refiere a los alelos en diferentes locus que no están asociados al azar, es decir, no están asociados en proporción a sus frecuencias. Si los alelos tienen un desequilibrio de ligamiento positivo, entonces los alelos aparecen juntos más frecuentemente de lo esperable si se asume su independencia estadística. Por el contrario, si los alelos tienen un desequilibrio de ligamiento negativo, entonces los alelos aparecen juntos menos frecuentemente de lo esperable si se asume su independencia estadística.

El término “*genotipo*” se refiere a una descripción de los alelos de un gen o genes contenidos en un individuo o una muestra. Como se utiliza aquí, no se distingue entre el genotipo de un individuo y el genotipo de una muestra a partir de este individuo. Aunque, normalmente, un genotipo se determina a partir de muestras de células diploides, un genotipo puede determinarse a partir de una muestra de células haploides, como una célula espermática.

El término “*haplotipo*” se refiere a una descripción de las variantes de un gen o genes contenidos en un único cromosoma, es decir, el genotipo de un único cromosoma. Un haplotipo es un conjunto de alelos heredados maternos, o un conjunto de alelos heredados paternos, en cualquier locus.

El término “*región diana*” se refiere a una región de un ácido nucleico que va a analizarse y que normalmente incluye al menos una región polimórfica.

Los aminoácidos individuales en una secuencia están representados aquí como AN o NA, en las que A es el aminoácido en la secuencia y N es la posición en la secuencia. En el caso de que la posición N sea polimórfica, es conveniente designar la variante más frecuente como A₁N y la variante menos frecuente como NA₂. De forma alternativa, el lugar polimórfico, N, se representa como A₁NA₂, en la que A₁ es el aminoácido en la variante más común y A₂ es el aminoácido en la variante menos común. Se utilizan los códigos de una letra o tres letras para designar los aminoácidos (véase Lehninger, BioChemistry 2^a ed., 1975, Worth Publishers, Inc. New York, NY: págs.

73-75). Por ejemplo, I50V representa un polimorfismo de un único aminoácido en la posición de aminoácido 50, en la que la isoleucina está presente en la variante de la proteína más frecuente en la población y la valina está presente en la variante menos frecuente. Las posiciones de aminoácido están numeradas en base a la secuencia de la proteína IL4R madura, como se describe a continuación.

“Astringente” como se utiliza aquí se refiere a condiciones de hibridación y lavados a 50°C o superior. También pueden seleccionarse otras condiciones de hibridación astringentes. Generalmente, las condiciones astringentes se seleccionan para que sean alrededor de 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente complementaria. Normalmente, las condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sal es de al menos de alrededor de 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es de al menos alrededor de 50°C. Como otros factores pueden afectar significativamente la astringencia de la hibridación, lo que incluye entre otros, la composición de bases, longitud de las cadenas de ácido nucleico, la presencia de solventes orgánicos o la extensión de bases no complementarias, la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de cualquiera de ellos.

Las representaciones de los nucleótidos y los cambios de un único nucleótido en secuencias de DNA son análogas. Por ejemplo, A398G representa un polimorfismo de un único nucleótido en la posición de nucleótido 398, en la que la adenina está presente en el alelo más frecuente (salvaje) en la población y la guanina está presente en el alelo menos frecuente (mutante). Las posiciones de nucleótidos están numeradas en base a la secuencia de la región codificante del IL4R proporcionada como ID. de SEC N°: 2, que se muestra a continuación. Quede claro que en una forma de doble cadena, la cadena complementaria de cada alelo contendrá la base complementaria en la posición polimórfica.

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de ácidos nucleicos, que están al alcance del experto en la materia, se exponen de forma completa en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Nucleic acid Hybridization (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1984); la serie, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); y la serie con actualizaciones trimestrales, Current Protocols in Human Genetics (Dracopoli *et al.*, eds., 1984, John Wiley & Sons, Inc.).

Asociación con la diabetes tipo 1

Como IL4R, IL-4 o IL-13 son una pequeña parte del complejo sistema de genes involucradas en una respuesta inmune, es esperable que el efecto de los locus del IL4R, IL-4 o IL-13 sea pequeño. Otros factores, como un genotipo del HLA del individuo, puede ejercer un efecto dominante que, en algunos casos, puede enmascarar el efecto de los genotipos del IL4R, IL-4 o IL-13. Por ejemplo, se conocen genotipos de HLA concretos que tienen un efecto importante sobre la probabilidad de padecer diabetes tipo 1 (véase Noble *et al.*, 1996, Am. J. Hum. Genet, 59:1134-1148). Los genotipos del IL4R, IL-4 o IL-13 serán probablemente más informativos como indicadores de predisposición a padecer diabetes tipo 1 entre los individuos que presenten genotipos de HLA que no confieran un aumento o reducción del riesgo. Además, como las frecuencias alélicas en otros locus relevantes para las enfermedades relacionadas con el sistema inmune son diferentes entre poblaciones y, por lo tanto, las poblaciones muestran diferentes riesgos de padecer enfermedades relacionadas con el sistema inmune, es esperable que el efecto de los genotipos de IL4R, IL-4 o IL-13 pueda ser de diferente magnitud en algunas poblaciones. Aunque la contribución de los genotipos del IL4R, IL-4 o IL-13 pueden ser relativamente menor en sí misma, la genotipificación de los locus de IL4R, IL-4 o IL-13 aportará información que es, no obstante, útil para la caracterización de la predisposición de un individuo a padecer diabetes tipo 1. La información del genotipo del IL4R, IL-4 o IL-13 puede ser particularmente útil si se combina con la información del genotipo de otros locus.

Métodos para la detección del riesgo de padecer enfermedades autoinmunes

La presente invención proporciona los métodos para la determinación del riesgo de un individuo de padecer cualquier enfermedad o trastorno autoinmune o cualquier enfermedad mediada por las Th-1. Tales enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, diabetes mellitus tipo 1 (diabetes mellitus dependiente de insulina o DMDI), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmune, vasculitis como la granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (lupus), escleroderma, esclerosis sistémica, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, espondiloartropatías como la espondilitis anquilosante, psoriasis, dermatitis herpetiforme, enfermedades de intestino inflamatorio, pénfigo vulgar y vitíligo. En ciertas realizaciones de la invención, los métodos se utilizan para determinar el riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1. Preferiblemente, el individuo es un humano.

Ácidos nucleicos

De acuerdo con esto, una realización de la invención es una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una porción de los genes del IL4R, IL4 o IL13, sus complementarios o variantes de los mismos. Preferiblemente dicha variante comprende al menos uno de los polimorfismos identificados aquí. Aún más preferiblemente, dicha variante comprende al menos uno de los polimorfismos que aquí se han identificado que están asociados con la diabetes tipo 1. Por lo tanto, en una realización, la molécula de ácido nucleico comprende al menos uno de los polimorfismos del IL4R, IL4, y/o IL13 que se proporcionan en la Tabla 2. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en cebadores y sondas específicos de los polimorfismos identificados en los genes del IL4R, IL4 o IL13, lo que incluye pero no se limita al ID. de SEC. N°: 3-19, 25-36, 37-53, 54-62, 69-74, 75-80 y 81-86.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser RNA, mRNA, DNA, cDNA, y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla.

Estas pueden codificar la cadena sentido, las regiones no codificantes, o la cadena antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir toda o una porción de la secuencia codificante del gen y además puede comprender regiones no codificantes adicionales como los intrones y las secuencias 3' y 5' no codificantes (lo que incluye, por ejemplo, las secuencias reguladoras). De forma adicional, la molécula de ácido nucleico puede fusionarse a una secuencia marcador, por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido que ayuda en el aislamiento o purificación del polipéptido.

Una molécula de ácido nucleico "aislada", como se utiliza aquí, es una que se ha separado de las secuencias nucleotídicas que normalmente flanquean la molécula de ácido nucleico y/o se ha purificado completamente o parcialmente de otro material biológico (por ejemplo, proteínas) normalmente asociado al ácido nucleico.

La molécula de ácido nucleico puede fusionarse a otras secuencias codificantes o reguladoras y aún considerarse aislada.

Por lo tanto, el DNA recombinante contenido en un vector se incluye en la definición de "aislada" como se utiliza aquí. Además, las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen las moléculas de DNA recombinante en células huésped heterólogas, así como las moléculas de DNA parcialmente o sustancialmente purificadas en solución. Las moléculas de ácido nucleico "aisladas" también incluyen los transcritos de RNA *in vivo* e *in vitro* de las moléculas de DNA de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico aislada o una secuencia de nucleótidos puede incluir una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos que se ha sintetizado mediante métodos químicos o recombinantes. Además, los polinucleótidos aislados incluyen las moléculas de DNA recombinante en organismos heterólogos, así como moléculas de DNA parcialmente o sustancialmente purificadas en solución. Los transcritos de RNA *in vivo* e *in vitro* de las moléculas de DNA de la presente invención también están englobados por las secuencias de nucleótidos "aisladas". Tales polinucleótidos son útiles en la elaboración del polipéptido codificado, como sondas para el aislamiento de secuencias homólogas (por ejemplo, de otras especies de mamíferos), para el mapeo de genes (por ejemplo, mediante una hibridación *in situ* con cromosomas), o para la detección de la expresión del gen en tejido (por ejemplo, tejido humano), como con un análisis de Northern blot.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender uno o más residuos de nucleótido modificados. La modificación puede estar en la porción de la base, azúcar y/o fosfato e incluye, por ejemplo, la halogenación, hidroxilación, alquilación o un enlazante y/o marcaje unidos. Las modificaciones además pueden comprender, por ejemplo, el marcaje, metilación, modificaciones internucleótido como los enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos), enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos), porciones salientes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos). También están incluidas las moléculas sintéticas que mimetizan a moléculas de ácido nucleico en su capacidad de unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, aquellas en las que enlaces peptídicos sustituyen los enlaces fosfato en el armazón de la molécula.

En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas de mRNA, cDNA y/o DNA genómico del IL4R, IL4 y/o IL13. La secuencia de nucleótidos de la región codificante del mRNA de IL4R está disponible en GenBank bajo el número de acceso X52425.1, los nucleótidos 176-2653 se proporcionan como ID. de SEC. N°: 2, que se muestra con una orientación de 5' a 3' en la Tabla 1, a continuación. El mRNA de IL4R se proporciona como ID. de SEC. N°: 1. Aunque sólo se muestra una cadena del ácido nucleico en la Tabla 1, los expertos en la materia reconocerán que los ID. de SEC. N°: 1 e ID. de SEC. N°: 2 identifican regiones de ácido nucleico genómico de doble cadena, y que las secuencias de ambas cadenas están totalmente especificadas mediante la información de secuencia que se proporciona. La secuencia de genómico del gen del IL4R está incluida en GenBank con el número de acceso AC004525.1 (ID. de SEC. N°: 88). La secuencia de nucleótidos de la región codificante del mRNA de IL4 está disponible en GenBank con el número de acceso M23442.1 (ID. de SEC. N°: 89) y la secuencia de nucleótidos de la región codificante del mRNA de IL13 está disponible en GenBank con el número de acceso U10307.1 (ID. de SEC. N°: 90).

Cebadores y Sondas

Por “oligonucleótido” se entiende un polímero de nucleótidos de cadena sencilla compuesto por más de 2 subunidades de nucleótido covalentemente unidos. En una realización dichos oligonucleótidos tienen entre alrededor de 10 y 1000 unidades de nucleótido, en otra realización, dichos oligonucleótidos tienen entre alrededor de 12 y 100 unidades de nucleótido. Los grupos azúcar de las subunidades de nucleótido pueden ser ribosa, desoxiribosa o derivados modificados de los mismos como la o-metilribosa. Las subunidades de nucleótido de un oligonucleótido pueden estar unidas mediante enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o mediante otros enlaces, lo que incluye pero no se limita a, enlaces infrecuentes o que no aparecen en la naturaleza, que no evitan la hibridación del oligonucleótido. Además, un oligonucleótido puede contener porciones de nucleótido o no nucleótido poco comunes. Un oligonucleótido como se define aquí es un ácido nucleico, preferiblemente DNA, pero puede ser RNA o contener una combinación de ribo- y desoxiribonucleótidos covalentemente unidos. Las sondas de oligonucleótido y los oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia definida pueden obtenerse mediante técnicas conocidas para los expertos en la materia, como mediante síntesis química o bioquímica, y mediante expresión *in vitro* o *in vivo* a partir de moléculas de ácido nucleico recombinantes, por ejemplo, vectores bacterianos o retrovirales. Como se utiliza aquí, un oligonucleótido no consiste en el DNA cromosómico salvaje o los productos de transcripción *in vivo* del mismo.

Las secuencias de cebadores y sondas pueden comprender análogos de DNA, RNA (oligonucleótidos - véanse anteriormente) o ácido nucleico como los análogos de ácido nucleico sin carga, lo que incluye pero no se limita a los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que se describen en la solicitud de patente internacional WO 92/20702 o los análogos morfolino que se describen en las patentes U.S. Nº 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047. Tales secuencias pueden sintetizarse de forma rutinaria utilizando una serie de técnicas actualmente disponibles.

Por ejemplo, una secuencia de DNA puede sintetizarse utilizando la química convencional de nucleótidos con fosforamidita y la maquinaria disponible de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.); DuPont, (Wilmington, Del.); o Milligen, (Bedford, Mass.). De forma similar, y cuando se desee, las secuencias pueden marcarse utilizando metodologías bien conocidas en la materia como se describe en las solicitudes de patente U.S. Nº 5.464.746, 5.424.414 y 4.948.882.

Los cebadores y sondas pueden utilizarse de varias formas y pueden definirse por su utilización específica. Por ejemplo, una “sonda de captura” está inmovilizada o puede inmovilizarse sobre un soporte sólido mediante cualquier método apropiado, lo que incluye, pero no se limita a: mediante unión covalente, adsorción, interacción hidrofóbica y/o electrostática, o mediante síntesis directa sobre un soporte sólido (véase concretamente la solicitud de patente WO 92 10092). Una “sonda de detección” puede marcarse mediante un marcador elegido, por ejemplo, isótopos radiactivos, enzimas, en particular enzimas capaces de actuar sobre un sustrato cromogénico, fluorogénico o luminescente (en particular una peroxidasa o una fosfatasa alcalina), compuestos químicos cromóforos, compuestos cromogénicos, fluorogénicos o luminescentes, análogos de bases nucleotídicas y ligandos como la biotina. Un “cebador” es una sonda que comprende, por ejemplo, entre 10 y 100 unidades de nucleótido y con una especificidad de hibridación bajo condiciones determinadas para la iniciación de una polimerización enzimática, por ejemplo en una técnica de amplificación como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), en un proceso de secuenciación, en un método de transcripción reversa y similares. Una utilización de una sonda es como sonda de un ensayo de hibridación; las sondas también pueden utilizarse como oligómeros de amplificación terapéutica *in vivo* o *in vitro*, o como agentes antisentido para bloquear o inhibir la transcripción génica o la traducción en células enfermas, infectadas o patogénicas.

Todos los oligonucleótidos, cebadores y sondas de la presente invención, que sean sondas de un ensayo de hibridación, oligonucleótidos para amplificación u oligonucleótidos ayudantes, pueden modificarse con grupos químicos para potenciar su funcionamiento o para facilitar la caracterización de los productos de amplificación. Por ejemplo, los oligonucleótidos de armazón modificado, como los que contienen grupos fosforotioato o metilfosfonato y que resultan en oligonucleótidos resistentes a la actividad nucleolítica de ciertas polimerasas o a enzimas nucleasa, pueden permitir la utilización de tales enzimas en una amplificación u otra reacción. Otro ejemplo de modificación involucra la utilización de enlazantes no nucleotídicos (por ejemplo, Arnold *et al.*, “Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes”, PE 0 313 219) que se incorporan entre nucleótidos en la cadena de ácido nucleico y que no interfieren con la hibridación o la elongación del cebador. Los oligonucleótidos para la amplificación también pueden contener mezclas de los nucleótidos deseados modificados y naturales.

El extremo 3' para amplificación puede bloquearse para evitar la iniciación de la síntesis de DNA como se describe en McDonough *et al.*, de título “Nucleic Acid Sequence Amplification”, WO 94/03472, que es de propiedad común con la presente invención. Una mezcla de diferentes oligonucleótidos para amplificación bloqueados en 3', o de oligonucleótidos bloqueados en 3' y no bloqueados, puede aumentar la eficiencia de la amplificación de ácido nucleico, como se ha descrito.

El extremo 5' de los oligonucleótidos puede modificarse para que sean resistentes a la actividad exonucleasa en 5' presente en algunas polimerasas de ácidos nucleicos. Tales modificaciones pueden realizarse mediante la adición de un grupo no nucleotídico al nucleótido terminal en 5' del cebador utilizando técnicas como las descritas en Arnold *et al.*, *supra*, de título “Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes”.

Una vez sintetizadas, las sondas de oligonucleótido seleccionadas pueden marcarse mediante cualquiera de los muchos métodos bien conocidos (por ejemplo, J. Sambrook, *supra*). Los marcajes útiles incluyen los radioisótopos así como los grupos de marcaje no radiactivo. Los marcajes isotópicos incluyen ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I , ^{57}Co y ^{14}C . Los marcajes isotópicos pueden introducirse en el oligonucleótido mediante técnicas conocidas en la materia como la traslación de la muesca, marcaje terminal, síntesis de la segunda cadena, utilización de transcripción reversa y mediante métodos químicos. Cuando se utilizan sondas radiomarcadas la hibridación puede detectarse mediante autoradiografía, contador de centelleo o contador gamma. El método de detección seleccionado dependerá del radioisótopo particular utilizado en el marcaje.

También pueden utilizarse materiales no isotópicos para el marcaje y pueden introducirse internamente en la secuencia de ácido nucleico o al final de la secuencia de ácido nucleico. Los nucleótidos modificados pueden incorporarse de forma enzimática o química. Las modificaciones químicas de la sonda pueden realizarse durante o tras la síntesis de la sonda, por ejemplo, a través de la utilización de grupos enlazantes no nucleotídicos como los descritos en Arnold *et al.*, *supra* "Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes". Los marcajes no isotópicos incluyen las moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, cofactores, sustratos de enzimas, haptenos u otros ligandos.

En una realización, las sondas están marcadas con un éster de acridinio. El marcaje con éster de acridinio puede realizarse como se describe en Arnold *et al.*, patente U.S. Nº 5.185.439, de título "Acridinium Ester Labeling and Purification of Nucleotide Probes," emitida el 9 de Feb. de 1993.

TABLA 1

ID. de SEC. Nº: 2

```

1   atgggggtggc tttgctctgg gctcctgttc cctgtgagct gcctgggcct gctgcaggtg
61  gcaagctctg ggaacatgaa ggtcttgcag gagccacact gcgtctccga ctacatgagc
121 atctctactt gcgagtggaa gatgaatggt cccaccaatt gcagcaccga gctccgcctg
181 ttgtaccagc tggtttttct gctctccgaa gcccacacgt gtatccctga gaacaacgga
241 ggcgcggggg gcgtgtgcca cctgctcatg gatgacgtgg tcagtgcgga taactataca
301 ctggacctgt gggctgggca gcagctgctg tggaagggt ccttcaagcc cagcgagcat
361 gtgaaaccca gggccccagg aaacctgaca gttcacacca atgtctccga cactctgctg
421 ctgacctgga gcaaccgta tccccctgac aattacctgt ataatcatct cacctatgca
481 gtcaacattt ggagtgaana cgaccgggca gatttcagaa tctataacgt gacctaccta
541 gaaccctccc tccgcctcgc agccagcacc ctgaagtctg ggatttcccta cagggcacgg
601 gtgagggcct gggctcagtg ctataacacc acctggagtg agtggagccc cagcaccaag

```

661 tggcacaact cctacagggg gcccttcgag cagcacctcc tgctgggcgt cagcggtttcc
 721 tgcattgtca tccctggcgt ctgcctgttg tgctatgtca gcatcaccaa gattaagaaa
 781 gaatgggtgg atcagattcc caaccagcc cgcagccgcc tcgtggctat aataatccag
 841 gatgctcagg ggtcacagtg ggagaagcgg tcccgaggcc aggaaccagc caagtgccca
 901 cactggaaga attgtcttac caagctcttg ccctgttttc tggagcaca catgaaaagg
 961 gatgaagatc ctacaaaggc tgccaaagag atgcctttcc agggctcttg aaaatcagca
 1021 tgggtgcccag tggagatcag caagacagtc ctctggccag agagcatcag cgtgggtgca
 1081 tgtgtggagt tgtttgaggc cccgggtggag tgtgaggagg aggaggagggt agaggaagaa
 1141 aaagggagct tctgtgcatc gctgagagc agcagggatg acttccagga ggaagggag
 1201 ggcattgttg cccggctaac agagagcctg ttccctggacc tgctcggaga ggagaatggg
 1261 ggcttttgcc agcaggacat gggggagtca tgcttcttc caccttcggg aagtacgagt
 1321 gctcacatgc cctgggatga gttcccaagt gcagggccca aggaggcacc tccctggggc
 1381 aaggagcagc ctctccacct ggagccaagt cctcctgcca gcccgaccca gagtccagac
 1441 aacctgactt gcacagagac gccctcgtc atgcaggca accctgctta ccgcagcttc
 1501 agcaactccc tgagccagtc accgtgtccc agagagcttg gtccagaccc actgctggcc
 1561 agacacctgg aggaagtaga acccgagatg ccctgtgtcc cccagctctc tgagccaacc
 1621 actgtgcccc aacctgagcc agaaacctgg gagcagatcc tccgccgaaa tgtcctccag
 1681 catggggcag ctgcagcccc cgtctcggcc cccaccagtg gctatcagga gtttgtacat
 1741 gcggtggagc aggggtggac ccaggccagt gcggtggttg gcttgggtcc cccaggagag
 1801 gctggttaca aggccttctc aagcctgctt gccagcagtg ctgtgtcccc agagaaatgt
 1861 ggggtttggg ctagcagtgg ggaagagggg tataagcctt tccaagacct cattcctggc
 1921 tgccctgggg accctgcccc agtccctgtc cccttgttca cctttggact ggacagggag
 1981 ccacctcgca gtccgcagag ctacatctc ccaagcagct cccagagca cctgggtctg
 2041 gagecggggg aaaaggtaga ggacatgcc aagccccac tccccagga gcaggccaca
 2101 gaccccttg tggacagcct gggcagtgcc attgtctact cagcccttac ctgccacctg
 2161 tgcggccacc tgaaacagtg tcatggccag gaggatggtg gccagacccc tgtcatggcc
 2221 agtccctgct gtggctgctg ctgtggagac aggtcctcgc cccctacaac cccctgagg
 2281 gcccagacc cctctccagg tggggttcca ctggaggcca gtctgtgtcc ggccctccctg
 2341 gcacctctcg gcattctcaga gaagagtaaa tctcatcat ccttccatcc tgccctggc
 2401 aatgctcaga gctcaagcca gacccccaaa atcgtgaact ttgtctccgt gggacccaca
 2461 tacatgaggg tctcttag

SNP

En un aspecto, se describe un método para la detección de un aumento o reducción del riesgo de un individuo de padecer una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1 mediante la detección de la presencia de uno o más SNP del IL4R, IL4 o IL13 en una muestra de ácido nucleico del individuo, en el que la presencia de dicho(s) SNP(s) indica un aumento o reducción del riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1. Los SNP pueden cualquier SNP en los locus del IL4R, IL4 o IL13, lo que incluye los SNP en los exones, intrones o regiones anteriores o posteriores. Ejemplos de tales SNP incluyen, pero no se limitan a los que se proporcionan en la Tabla 2, a continuación, y se discuten en detalle en los Ejemplos. En una realización, los SNP presentes en los locus del IL4R, IL4 o IL13 se identifican mediante genotipificación de los SNP del IL4R, IL4 o IL13.

En ciertas realizaciones, el genotipo de un SNP del IL4R, IL4 o IL13 puede utilizarse para determinar el riesgo de un individuo de padecer una enfermedad autoinmune. En otras realizaciones, pueden utilizarse los genotipos de una serie de SNP del IL4R, IL4 o IL13. Por ejemplo, en ciertas realizaciones pueden utilizarse los genotipos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 de los SNP de la Tabla 2 para determinar el riesgo de un individuo de padecer una enfermedad autoinmune. En otras realizaciones, pueden utilizarse ciertas combinaciones de SNP en el mismo locus o en locus diferentes, como se describe en los Ejemplos, a continuación.

ES 2 279 916 T3

TABLA 2

SNP de IL4R, IL4 e IL13

SNP de IL4R							
n° ID dbSNP	Exón *	Variante	Alelo salv.	Alelo var.	n° acc. X52425.1 (cDNA)	AC004525.1 (genómico)	Nombre formal SNP
	P	C(-3223)T	G	A	NA	128387	G128387A
	P	T(-1914)C	A	G	NA	127078	A127078G
	3	150V	A	G	398	94272	A398G
	4	N142N	C	T	676	92548	C676T
	4	C92516T	C	T	NA	92516	C92516T
	4	A92417T	A	T	NA	92417	A92417T
2234896	7	P249P	C	G	997	80189	C997G
2234897	9	F288F	T	C	1114	76868	T1114C
1805011	9	E375A	A	C	1374	76608	A1374C
	9	E375E	G	A	1375	76607	G1375A
2234898	9	L389L	G	T	1417	76565	G1417T
1805012	9	C406R	T	C	1466	76516	T1466C
2234899	9	C406C	C	T	1468	76514	C1468T
2234900	9	L408L	T	C	1474	76508	T1474C
1805013	9	S411L	C	T	1482	76500	C1482T
1805015	9	S478P	T	C	1682	76300	T1682C
1801275	9	Q551R	A	G	1902	76080	A1902G
	9	V554I	G	A	1910	76072	G1910A
	9	P650S	C	T	2198	75784	C2198T
1805016	9	S727A	T	G	2429	75553	T2429G
	9	G759G	C	T	2567	75455	C2567T
1805014	9	S761P	T	C	2531	75451	T2531C
	9	P774P	T	C	2572	75410	T2572C
1049631	9	3' UTR	G	A	3044	74938	G3044A
8832	9	3' UTR	A	G	3289	74693	A3289G
8674	9	3' UTR	C	T	3391	74581	C3391T
SNP de IL4							
Descripción SNP	Exón	Variante	Alelo salv.	Alelo var.	n° acc. Genbank	Posición Cromosoma	Nombre formal SNP

5' (-524)	P	(-524)	C	T	M23442.1	5q31	C582T
SNP de IL13							
Descripción SNP	Exón	Varian- te	Alelo salv.	Alelo var.	n° acc. Genbank	Posición Cromoso- ma	Nombre formal SNP
(-1512)	P	(-1512)	A	C	U10307.1	5q31	A(-1512)C
(-1112)	P	(-1112)	C	T	U10307.1	5q31	C(-1112)T
Intrón 3	-	Intrón 3	C	T	U10307.1	5q31	C4045T
R110Q	4	R110Q	G	A	U10307.1	5q31	G4166A
P: Región del promotor							
* La numeración de los exones se basa en el esquema descrito por Ober et al., 2000, Am J Hum Genet, 66:517-526. Otros esquemas de numeración están disponibles y el experto en la materia será capaz de identificar el SNP y el esquema utilizado.							

Métodos de genotipificación

En los métodos descritos, los alelos presentes en una muestra se identifican mediante la identificación del nucleótido presente en uno o más de los puntos polimórficos. Cualquier tipo de tejido que contenga el ácido nucleico del IL4R, IL4 o IL 13 puede utilizarse para la determinación de los genotipos de IL4R, IL4 o IL13 de un individuo. Se conocen en la materia una serie de métodos para la identificación de los nucleótidos presentes en los lugares polimórficos. El método particular utilizado para identificar el genotipo no es un aspecto crítico de la invención. Aunque por consideraciones de realización, coste y conveniencia algunos métodos particulares serán más deseables que otros, queda claro que cualquier método que pueda identificar el nucleótido presente proporcionará la información necesaria para identificar el genotipo. Los métodos de genotipificación preferibles involucran la secuenciación de DNA, la amplificación específica de alelo o la detección basada en sondas de ácido nucleico amplificado.

Los alelos de IL4R, IL4 o IL13 pueden identificarse mediante métodos de secuenciación de DNA, como el método de terminación de la cadena (Sanger *et al.*, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463-5467), que es bien conocido en la materia. En una realización, se amplifica una subsecuencia del gen que incluye el lugar polimórfico y se clona en un plásmido adecuado y luego se secuencian, o bien se secuencian directamente. La secuenciación basada en la PCR se describe en la patente U.S. Nº 5.075.216, Brow, en PCR Protocols, 1990, (Innis *et al.*, Eds. Academic Press, San Diego), capítulo 24; y Gyllensten, en PCR Technology, 1989 (Erlich, Ed. Stockton Press, New York), capítulo 5; ambos se incorporan aquí como referencia. Normalmente, la secuenciación se realiza utilizando uno de los secuenciadores de DNA automáticos que están comercialmente disponibles de, por ejemplo, PE Biosystems (Foster City, CA), Pharmacia (Piscataway, NJ), Genomix Corp. (Foster City, CA), LI-COR Biotech (Lincoln, NE), GeneSys technologies (Sauk City, WI) y Visible Genetics, Inc. (Toronto, Canada).

Los alelos de IL4R, IL4 o IL13 también pueden identificarse utilizando métodos de genotipificación basados en la amplificación. Varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la materia pueden utilizarse para detectar cambios de nucleótido en un ácido nucleico diana. Un método preferible es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ahora es bien conocida en la materia, y se describe en las patentes U.S. Nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188. Ejemplos de los numerosos artículos publicados describiendo los métodos y aplicaciones de la PCR se encuentran en PCR Applications, 1999, (Innis *et al.*, Eds., Academic Press, San Diego), PCR Strategies, 1995, (Innis *et al.*, Eds., Academic Press, San Diego); PCR Protocols, 1990, (Innis *et al.*, Eds., Academic Press, San Diego); y PCR Technology, 1989, (Erlich, Ed., Stockton Press, New York); Proveedores comerciales como PE Biosystems (Foster City, CA) comercializan reactivos de PCR y publican protocolos de PCR.

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (Wu y Wallace, 1988, *Genomics* 4:560-569); el ensayo de desplazamiento de la cadena (Walker *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396, Walker *et al.* 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:1691-1696, y la patente U.S. Nº 5.455.166); y varios sistemas de amplificación basados en la transcripción, lo que incluye los métodos descritos en las patentes U.S. Nº 5.437.990, 5.409.818 y 5.399.491, el sistema de amplificación de la transcripción (TAS) (Kwoh *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173-1177); y la replicación de la secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874-1878 y WO 92/08800). Alternativamente, pueden utilizarse los métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, como la amplificación con la replicasa Qb (Kramer *et al.*, 1989, *Nature*, 339:401-402 y Lomeli *et al.*, 1989, *Clin. Chem.*, 35:1826-1831). Una revisión de los métodos de amplificación conocidos se proporcionan en Abramson *et al.*, 1993, *Current Opinion in Biotechnology*, 4:41-47, se incorpora aquí como referencia.

La genotipificación también puede realizarse mediante la detección y análisis del mRNA de IL4R, IL4 o IL13 bajo condiciones en las que tanto el cromosoma materno como el paterno se transcriban. La amplificación de RNA puede realizarse mediante una transcripción reversa inicial del RNA diana utilizando, por ejemplo, una transcriptasa reversa viral, y luego amplificando el cDNA resultante, o utilizando una transcripción reversa y una reacción en cadena de la polimerasa combinadas a elevada temperatura (RT-PCR), como se describe en las patentes U.S. Nº 5.310.652, 5.322.770, 5.561.058, 5.641.864 y 5.693.517 (véase también Myers y Sigua, 1995, en *PCR Strategies*, *supra*, capítulo 5).

Los alelos de IL4R, IL4 o IL13 también pueden identificarse utilizando métodos de amplificación específica de alelo o de extensión del cebador, que se basan en el efecto inhibitorio de una falta de complementariedad terminal del cebador sobre la capacidad de una polimerasa de DNA de extender el cebador. Para detectar la secuencia de un alelo utilizando una amplificación específica de alelo o método basado en la extensión, se escoge un cebador complementario a los genes del IL4R, IL4 o IL13 de forma que el nucleótido del extremo 3' hibrida en la posición polimórfica. En presencia del alelo a identificar, el cebador es complementario de la secuencia diana en el extremo 3' y el cebador se extiende. En presencia sólo del otro alelo, el cebador tiene ausencia de complementariedad en 3' en relación a la secuencia diana y la extensión del cebador se elimina o se reduce significativamente. Los métodos basados en la amplificación específica de alelo o en la extensión se describen en, por ejemplo, la patente U.S. Nº 5.137.806, 5.595.890, 5.639.611 y la patente U.S. Nº 4.851.331.

Utilizando la genotipificación basada en la amplificación específica de alelo, la identificación de los alelos sólo requiere la detección de la presencia o ausencia de las secuencias diana amplificadas. Los métodos para la detección de las secuencias diana amplificadas son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la electroforesis en gel (véase Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.) y los ensayos de hibridación de sondas descritos anteriormente se han utilizado ampliamente para detectar la presencia de ácidos nucleicos.

Los métodos de genotipificación basados en la amplificación específica de alelo pueden facilitar la identificación de haplotipos, como se describe en los ejemplos. Esencialmente, la amplificación específica de alelo se utiliza para amplificar una región que incluye múltiples lugares polimórficos de sólo uno de los dos alelos en una muestra heterocigota. Las variantes del SNP presentes en la secuencia amplificada se identifican entonces, mediante la hibridación de sondas o secuenciación.

Un método alternativo sin sondas, denominado aquí como método de PCR cinética, en la que la generación de ácido nucleico amplificado se detecta mediante la monitorización del aumento de la cantidad total de DNA de doble cadena en la mezcla de reacción, se describe en Higuchi *et al.*, 1992, *BiolTechnology*, 10:413-417; Higuchi *et al.*, 1993, *BiolTechnology*, 11: 1026-1030; Higuchi y Watson, en *PCR Applications*, *supra*, capítulo 16; la patente U.S. Nº 5.994.056 y 6.171.785, y las publicaciones de patente europea Nº 487.218 y 512.334. La detección del DNA diana de doble cadena se basa en el aumento de la fluorescencia que los colorantes de unión a DNA, como el bromuro de etidio, muestran cuando se unen a DNA de doble cadena. El aumento de DNA de doble cadena que resulta de la síntesis de secuencias diana resulta en un aumento en la cantidad de colorante unido a DNA de doble cadena y a un aumento detectable concomitante de la fluorescencia. Para la genotipificación utilizando los métodos de PCR cinética, las reacciones de amplificación se realizan utilizando un par de cebadores específicos de uno de los alelos, de forma que cada amplificación puede indicar la presencia de un alelo particular. Realizando dos amplificaciones, una utilizando cebadores específicos del alelo salvaje y una utilizando cebadores específicos del alelo mutante, puede determinarse el genotipo de la muestra respecto a este SNP. De forma similar, realizando cuatro amplificaciones, cada una de ellas con uno de los posibles pares utilizando cebadores específicos de alelo tanto en los cebadores anteriores como en los posteriores, puede determinarse el genotipo de la muestra respecto a dos SNP. Esto proporciona información del haplotipo de un par de SNP.

Los alelos también pueden identificarse utilizando métodos basados en sondas, que se basan en la diferencia en la estabilidad de los dúplex de hibridación formados entre una sonda y su correspondiente secuencia diana que comprende un alelo de IL4R, IL4 o IL13. Bajo condiciones de hibridación lo suficientemente estrictas, se forman dúplex estables sólo entre una sonda y la secuencia de su alelo diana y no con las secuencias de otros alelos. La presencia de dúplex de hibridación estable puede detectarse mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos. En general, es preferible amplificar un ácido nucleico que incluye un lugar polimórfico de interés previamente a la hibridación para facilitar su detección. Sin embargo, esto no es necesario si puede obtenerse suficiente ácido nucleico sin una amplificación.

Una sonda adecuada para su utilización en los métodos basados en sondas de la presente invención, que contiene una región de hibridación sustancialmente complementaria o exactamente complementaria a la región diana de los ID. de SEC. N°: 2, 88, 89 o 90, o la complementaria de los ID. de SEC. N°: 2, 88, 89 o 90, en las que la región diana incluye el lugar polimórfico, y es exactamente complementaria de una de las dos secuencias alélicas en el lugar polimórfico, puede seleccionarse utilizando las reglas que aquí se proporcionan y que son bien conocidas en la materia. De forma similar, las condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño exacto y de la secuencia de la sonda, pueden seleccionarse de forma empírica utilizando las reglas que aquí se proporcionan y que son bien conocidas en la materia. La utilización de sondas de oligonucleótido para detectar variaciones de nucleótidos, lo que incluye diferencias de un único par de bases en la secuencia, se describe en, por ejemplo, Conner *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:278-282, y la patente U.S. N° 5.468.613 y 5.604.099.

En realizaciones preferibles de los métodos basados en sondas para la determinación de los genotipos de IL4R, IL4 o IL13, se amplifican múltiples secuencias de ácido nucleico de los genes de IL4R, IL4 o IL13 que incluyen el lugar polimórfico, y se hibridan a un conjunto de sondas bajo condiciones de hibridación lo suficientemente estrictas. Los alelos presentes se infieren del patrón de unión de las sondas a las secuencias diana amplificadas. En esta realización, se realiza la amplificación para proporcionar suficiente ácido nucleico para el análisis mediante la hibridación de sondas. Por lo tanto, los cebadores se diseñan de forma que las regiones de los genes de IL4R, IL4 o IL13 que incluyen los lugares polimórficos se amplifican independientemente del alelo presente en la muestra. La amplificación independiente del alelo se consigue utilizando cebadores que hibridan con regiones conservadas de los genes de IL4R, IL4 o IL13. Los genes de IL4R, IL4 o IL13 contienen muchas regiones invariables o monomórficas y pueden seleccionarse rutinariamente cebadores adecuados independientes de alelo de los ID. de SEC. N°: 1, 88, 89 o 90. Un experto reconocerá que, normalmente, la optimización experimental de un sistema de amplificación es útil.

Los formatos de ensayo adecuados para la detección de los híbridos formados entre las sondas y las secuencias de ácido nucleico diana en una muestra son conocidos en la materia e incluyen el formato de diana inmovilizada (dot-blot) y el formato de ensayo de sonda inmovilizada (dot-blot inverso o line-blot). Los formatos de ensayo de dot blot y dot blot inverso se describen en las patentes U.S. N° 5.310.893, 5.451.512, 5.468.613 y 5.604.099.

En un formato de dot-blot, el DNA diana amplificado se inmoviliza sobre un soporte sólido, como una membrana de nylon. El complejo membrana-diana se incuba con sondas marcadas bajo condiciones de hibridación adecuadas, la sonda no hibridada se elimina mediante lavado bajo condiciones de astringencia adecuada, y se monitoriza la presencia de sonda unida a la membrana. Un ensayo de dot-blot preferible se describe en los ejemplos.

En el formato de dot-blot inverso (o line-blot), las sondas se inmovilizan sobre un soporte sólido, como una membrana de nylon o una placa microtitulada. El DNA diana está marcado, normalmente durante la amplificación mediante la incorporación de cebadores marcados. Pueden estar marcados uno o ambos cebadores. El complejo membrana-sonda se incuba con el DNA diana amplificado marcado bajo condiciones de hibridación adecuadas, el DNA diana no hibridado se elimina mediante lavado bajo condiciones de astringencia adecuada, y se monitoriza la presencia de DNA diana unido a la membrana. Un ensayo preferible de detección de line-blot inverso se describe en los ejemplos.

La genotipificación basada en sondas puede realizarse utilizando un ensayo "TaqMan" o "nucleasa 5'" como se describe en las patentes U.S. N° 5.210.015, 5.487.972 y 5.804.375; y en Holland *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280. En el ensayo TaqMan, se añaden sondas de detección marcadas que hibridan con la región amplificada en la mezcla de reacción de amplificación. Las sondas están modificadas para evitar que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de DNA. La amplificación se realiza utilizando una polimerasa de DNA que posee actividad exonucleasa de 5' a 3', por ejemplo, la polimerasa de DNA Tth. Durante cada paso de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que hibrida con el ácido nucleico diana a continuación del cebador que se va a extender se degrada por la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la polimerasa de DNA. Por lo tanto, la síntesis de una nueva cadena diana también resulta en la degradación de una sonda, y la acumulación del producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.

Cualquier método adecuado para la detección del producto de degradación puede utilizarse en el ensayo TaqMan. En un método preferible, las sondas de detección están marcadas con dos colorantes fluorescentes, y uno de ellos es capaz de bloquear la fluorescencia del otro colorante. Los colorantes están unidos a la sonda, preferiblemente uno está unido al extremo 5' y el otro está unido a un punto interno, de forma que el bloqueo ocurre cuando la sonda está en forma no hibridada y de forma que la escisión de la sonda por la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la polimerasa de DNA ocurre entre los dos colorantes. La amplificación resulta en la escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación concomitante del bloqueo y un aumento de la fluorescencia observable del colorante inicialmente bloqueado. La acumulación de producto de degradación se monitoriza mediante la medida del aumento en la reacción de fluorescencia. Las patentes U.S. N° 5.491.063 y 5.571.673 describen métodos alternativos para la detección de la degradación de sonda que aparece de forma concomitante con la amplificación.

El ensayo TaqMan puede utilizarse con cebadores de amplificación específicos de alelo de forma que la sonda se utiliza sólo para detectar la presencia de producto amplificado. Tal ensayo se realiza como se describe para la PCR cinética descrita anteriormente. Alternativamente, el ensayo TaqMan puede utilizarse con una sonda específica de la diana.

Ejemplos de otras técnicas que pueden utilizarse para la genotipificación basada en sondas incluyen, pero no se limitan a, Amplifluor™, intercalado-unión de colorantes, transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET), método de amplificación de la señal de hibridación (HSAM), Sondas HYB™, tecnología invasor/cleavasa (Invader/CFLP™), balizas moleculares™, Origen™, amplificación de la ramificación basada en el DNA (RAM™), amplificación de círculo rodante (RCA™), Scorpions™, amplificación de desplazamiento de la cadena (SDA).

Los formatos de ensayo descritos anteriormente normalmente utilizan oligonucleótidos marcados para facilitar la detección de los dúplex híbridos. Los oligonucleótidos pueden estar marcados mediante la incorporación de una señal detectable mediante métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, immunoquímicos, radiológicos, radioquímicos o químicos. Los marcajes útiles incluyen el ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (como se utiliza normalmente en los ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Los oligonucleótidos marcados de la invención pueden sintetizarse y marcarse utilizando las técnicas descritas anteriormente para la síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, un ensayo de dot-blot puede realizarse utilizando sondas marcadas con biotina, como se describe en Levenson *et al.*, 1989, en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.*, Eds., Academic Press. San Diego), págs 99-112. Tras la hibridación del DNA diana inmovilizado con las sondas biotiniladas bajo condiciones específicas de secuencia, las sondas que permanecen unidas se detectan mediante una primera unión a la biotina de avidina-peroxidasa de rábano picante (A-HRP) o estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP), que entonces se detecta realizando una reacción en la que la HRP cataliza un cambio de color de un cromógeno.

Sea cual sea el método para la determinación de cuales oligonucleótidos de la invención hibridan selectivamente con las secuencias alélicas de IL4R, IL4 o IL13 en una muestra, la característica principal del método de tipificación involucra la identificación de los alelos de IL4R, IL4 o IL13 presentes en la muestra mediante la detección de las secuencias variantes presentes.

La presente invención también está relacionada con los métodos para la determinación del riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1, lo que comprende, la detección de 2 o más, especialmente 6, 7, 8 o los 10 polimorfismos de IL4R que se listan en la Tabla 21 en una muestra de ácido nucleico de un individuo, en el que la presencia de dicho(s) polimorfismo(s) indica el riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1.

La presente invención también está relacionada con un equipo, una unidad contenedora que comprende los componentes útiles para poner en práctica el presente método. Un equipo útil puede contener sondas de oligonucleótido específicas de los alelos de IL4R, IL4 o IL13 así como las instrucciones para su utilización para determinar el riesgo de padecer una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1. En algunos casos, las sondas de detección pueden estar fijadas a una membrana de soporte apropiada. El equipo también puede contener cebadores de amplificación para amplificar las regiones de los locus de IL4R, IL4 o IL13 que incluyen los lugares polimórficos, y tales cebadores son útiles en la realización preferible de la invención. Alternativamente, los equipos útiles pueden contener un conjunto de cebadores que comprende un cebador específico de alelo para la amplificación específica de los alelos de IL4R, IL4 o IL13. Otros componentes opcionales de los equipos incluyen reactivos adicionales utilizados en los métodos de genotipificación como se describen aquí. Por ejemplo, un equipo puede contener de forma adicional un agente para catalizar la síntesis de productos de extensión del cebador, nucleósidos trifosfato sustrato, reactivos para el marcaje y/o detección del ácido nucleico (por ejemplo, un conjugado avidina-enzima, sustrato del enzima y cromógeno si el marcaje es biotina) y los tampones apropiados para las reacciones de amplificación o hibridación.

La presente invención también está relacionada con un chip, un soporte con oligonucleótidos inmovilizados útiles para la práctica del presente método. Un chip útil puede contener sondas de oligonucleótido específicas de los alelos de IL4R, IL4, IL13 o ciertas combinaciones de alelos de IL4R, IL4 y/o IL13. Los oligonucleótidos pueden estar inmovilizados sobre un sustrato, por ejemplo, una membrana o vidrio. Los oligonucleótidos pueden, pero no es necesario, estar marcados. En algunas realizaciones, el chip puede ser un microchip. En algunas realizaciones, el chip puede comprender uno o más oligonucleótidos utilizados para detectar la presencia de dos o más alelos de IL4R, IL4, IL13 o ciertas combinaciones de alelos de IL4R, IL4 y/o IL13.

Los ejemplos de la presente invención que se presentan a continuación se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos y no para limitar el alcance de la invención. Varias realizaciones de la invención dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen los Ejemplos serán obvias para los expertos en la materia a partir de la lectura del texto anterior y de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Protocolo de genotipificación: identificación basada en sondas de los alelos de IL4R, IL4 e IL13

Este ejemplo describe un método para la genotipificación de SNP en los locus de IL4R, IL4 e IL13 que están asociados con la diabetes tipo 1. Se utilizaron dos métodos de genotipificación diferentes, el ensayo de line blot y el termociclado cinético, en función de la región y del gen genotipificado.

ES 2 279 916 T3

Ensayo de line-blot para la identificación de 8 SNP de IL4R, 1 SNP de IL4 y 2 SNP de IL13

Ocho ejemplos de SNP en el gen de IL4R humano (listado en la Tabla 6), un ejemplo de SNP en el gen de IL4 humano (Tabla 2) y dos ejemplos de SNP en el gen de IL13 humano (Tabla 2) se genotipificaron utilizando este método. Cada SNP se describe mediante su posición en la secuencia de referencia de acceso en GenBank. Por ejemplo, el SNP 1 de la Tabla 6 se encuentra en la posición 398 de X52425.1 (ID. de SEC. N°: 1), en el que está presente un nucleótido "A". El alelo variante en esta posición tiene un nucleótido "G". Los SNP se denominarán mediante el n° de SNP en el texto subsiguiente.

Las regiones de los genes de IL4R, IL4 e IL13 que incluyen los SNP se amplificaron y se identificaron los nucleótidos presentes mediante la hibridación de sondas. La detección de sondas se realizó utilizando un formato de sondas inmovilizadas (line blot).

Amplicones y cebadores

Los pares de cebadores utilizados para amplificar las regiones que incluyen los ocho SNP de IL4R se listan en la Tabla 7 (ID. de SEC. N°: 25-36) y los que se utilizan para amplificar las regiones que incluyen los SNP de IL4 y los dos SNP de IL13 se listan en la Tabla 30 (ID. de SEC. N°: 69-74). Los SNP de IL4R número 3, 4 y 5 (Tabla 6) se coamplificaron en el mismo fragmento de 228 pares de bases. Los cebadores se modificaron en el fosfato 5' mediante la conjugación con biotina. Los reactivos para la síntesis de oligonucleótidos con un marcaje de biotina unido en el fosfato 5' están comercialmente disponibles de Clontech (Palo Alto, CA) y Glenn Research (Sterling, VA). Un reactivo preferible es Biotin-ON de Clontech.

Cebadores de amplificación

La amplificación de seis regiones del gen de IL4R, que incluyen ocho lugares polimórficos, la región del gen de IL4, que incluye un lugar polimórfico, y las dos regiones del gen de IL13, que incluye dos lugares polimórficos, se realizó utilizando los pares de cebadores que se muestran a continuación. Todos los cebadores se muestran con orientación de 5' a 3'.

Los siguientes cebadores amplifican una región de 114 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 398 del gen de IL4R.

RR192B (ID. de SEC. N°: 25) CAGCCCCTGTGTCTGCAGA

RR193B (ID. de SEC. N°: 31) GTCCAGTGTATAGTTATCCGCACTGA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 163 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 676.

DBM0177B (ID. de SEC. N°: 26) CTGACCTGGAGCAACCCGTA

DBM0178B (ID. de SEC. N°: 32) ACTGGGCCTCTGCTGGTCA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 228 pares de bases que incluye las posiciones de nucleótido 1374, 1417 y 1466 del gen de IL4R.

DBM0023B (ID. de SEC. N°: 27) ATTGTGTGAGGAGGAGGAGGAGGTA

DBM0022B (ID. de SEC. N°: 33) GTTGGGCATGTGAGCACTCGTA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 129 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 1682 del gen de IL4R.

DBM0097B (ID. de SEC. N°: 28) CTCGTCATCGCAGGCAA

DBM0098B (ID. de SEC. N°: 34) AGGGCATCTCGGGTTCTA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 198 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 1902 del gen de IL4R.

RR200B (ID DE SEC. N°: 29) GCCGAAATGTCCTCCAGCA

RR178B (ID DE SEC. N°: 35) CCACATTTCTCTGGGGACACA

ES 2 279 916 T3

Los siguientes cebadores amplifican una región de 177 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 2531 del gen de IL4R.

DBM0112B (ID DE SEC. N°: 30) CCGGCCTCCCTGGCA

DBM0071B (ID DE SEC. N°: 36) GCAGACTCAGCAACAAGAGG

Los siguientes cebadores amplifican una región de 107 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 582 de la región promotora del gen de IL4R.

RR169B (ID. de SEC. N°: 69) ACTAGGCCTCACCTGATACGA

RR170B (ID. de SEC. N°: 72) CATAGAGGCAGAATAACAGGCAGA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 118 pares de bases que incluye la posición de nucleótido 4045 del intrón 3 del gen de IL13.

DBM0165B (ID DE SEC. N°: 70) CTCGGACATGCAAGCTGGAA

DBM0166B (ID DE SEC. N°: 73) ACTGAATGAGACAGTCCCTGGA

Los siguientes cebadores amplifican una región de 187 pares de bases que incluye el codón 4166 del exón 4 del gen de IL13.

DBM0167B (ID. de SEC. N°: 71) AATCGAGGTGGCCAGTTTGTA

DBM0168B (ID. de SEC. N°: 74) CCTAACCTCCTTCCCGCCTA

Amplificación

La amplificación por PCR se realizó en un volumen total de reacción de 25-100 μ l que contienen los siguientes reactivos:

0,2 ng/ μ l de DNA genómico humano purificado

0,2 mM de cada cebador

800 mM dNTP total (200 mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

70 mM KCl

12 mM Tris-HCl, pH 8,3

3 mM MgCl₂,

0,25 unidades/ μ l polimerasa de DNA AmpliTaq Gold™*

* desarrollada y elaborada por Hoffmann-La Roche y comercialmente disponible de Applied (Foster City, CA).

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp™ PCR System 9600 (Applied, Foster City, CA), utilizando el perfil de ciclado de temperaturas específico que se muestra a continuación.

Incubación pre-reacción: 94°C durante 12,5 minutos

33 ciclos: desnaturalización: 95°C durante 45 segundos

hibridación: 61°C durante 30 segundos

extensión: 72°C durante 45 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Mantenimiento: 10°C - 15°C

Detección de sondas

Las sondas preferibles utilizadas para identificar los nucleótidos presentes en los 8 SNP presentes en los ácidos nucleicos amplificados de IL4R se describen en la Tabla 3. Se muestran dos sondas para la detección de T1466; se utilizó una mezcla de las dos sondas.

Las sondas preferibles utilizadas para identificar los nucleótidos presentes en el SNP presente en los ácidos nucleicos amplificados de IL4 y los dos SNP presentes en los ácidos nucleicos amplificados de IL13 se describen en la Tabla 29. Todas las sondas se muestran con orientación de 5' a 3'.

Ensayo de hibridación de sondas, formato de sondas inmovilizadas

En el formato de sondas inmovilizadas, las sondas se inmovilizaron en un soporte sólido previamente a su utilización en la hibridación. El complejo de sonda-soporte se sumergió en una solución que contenía ácido nucleico amplificado desnaturalizado (marcado con biotina) para permitir que ocurra la hibridación. El ácido nucleico no unido se eliminó mediante lavado bajo condiciones de hibridación astringentes, y el ácido nucleico que permanece unido a las sondas inmovilizadas se detectó utilizando una reacción cromogénica. Los detalles del ensayo se describen a continuación.

Para su utilización en el formato de detección de sondas inmovilizadas, descrito a continuación, se unió una porción al fosfato 5' de la sonda para facilitar su inmovilización sobre un soporte sólido. Véase Cheng *et al.*, 1999, Genome Res 9:936-949, incorporada aquí como referencia. Preferiblemente, se une albúmina sérica bovina (BSA) al fosfato 5' esencialmente como se describe en Tung *et al.*, 1991, Bioconjugate Chem., 2:464-465. Alternativamente, se añade una cola de poli-T al extremo 5' como se describe en la patente U.S. N° 5.451.512.

Las sondas se aplicaron en un formato lineal en láminas de membrana de nylon (por ejemplo, filtros de nylon BioDyne™ B, Pall Corp., Glen Cove, NY) utilizando un dispensador Linear Stripper y controlador Multispense2000™ (IVEK, N. Springfield, VT). La detección del alelo salvaje del SNP n° 5 (Tabla 6) se realizó utilizando una mezcla de dos sondas como se lista; esta mezcla permite la detección del SNP n° 5 de forma independiente de otros SNP cercanos. Los títulos de sonda se eligieron de forma que alcanzan el equilibrio de señal entre las variantes alélicas; los títulos utilizados se proporcionan en la Tabla de sondas anterior. Cada lámina se cortó en tiras de entre 0,35 y 0,5 cm de ancho. Para desnaturalizar los productos de amplificación, se añadieron 20 µl de producto de amplificación (basado en una reacción de 50 µl) a 20 µl de solución de desnaturalización (NaOH al 1,6%) y se incubó a temperatura ambiente para completar la desnaturalización.

El producto de amplificación desnaturalizado (40 µl) se añadió al pocillo de una bandeja de tipificación que contiene 3 ml de tampón de hibridación (4X SSPE, SDS al 0,5%) y la tira de membrana.

Se permitió que las hibridaciones sucedieran durante 15 minutos a 55°C en un baño de agua rotatorio. Tras la hibridación, la solución de hibridación se aspiró, la tira se lavó en 3 ml de tampón de lavado templado (2X SSPE, SDS al 0,5%) agitando suavemente las tiras, y se aspiró tampón de lavado. Tras el lavado, las tiras se incubaron en 3 ml de solución de conjugado enzimático (3,3 ml de tampón de hibridación y 12 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP)) en baño de agua rotatorio durante 5 minutos a 55°C. Entonces las tiras se lavaron con tampón de lavado, como anteriormente, se incubaron en tampón de lavado a 55° durante 12 minutos (lavado astringente), y finalmente se lavaron con tampón de lavado de nuevo.

El ácido nucleico diana, ahora marcado con HRP, que permanece unido al producto de amplificación inmovilizado se visualizó como sigue. Se preparó una solución de revelado mediante la mezcla de 100 ml de tampón citrato (citrato sódico 0,1 M, pH 5,0), 5 ml de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (2 mg/ml de TMB en polvo de Fluka, Milwaukee, WI, disuelto en EtOH al 100%), y 100 µl de peróxido de hidrógeno al 3%. Las tiras se lavaron inicialmente en citrato sódico 0,1 M (pH 5,0) durante 5 minutos, luego se incubaron en la solución de revelado con agitación suave durante entre 8 y 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El TMB, que inicialmente no tiene color, se convierte mediante la HRP unida a la diana, en presencia de peróxido de hidrógeno en un precipitado coloreado. Las tiras reveladas se lavaron en agua durante varios minutos y se fotografiaron inmediatamente.

Termociclado cinético para identificar 2 SNP del promotor de IL4R y 2 del promotor de IL13

Los dos SNP del promotor de IL4R y los dos del promotor de IL13 se genotipificaron utilizando una PCR específica de alelo en un termociclador PE9700 (ABI) midiendo la fluorescencia del SyBr Green (Molecular Probes) (Higuchi, Fockler, Dollinger, Watson. Biotechnology 11:1026-30 (1993)). Para cada DNA, se realizaron dos amplificaciones en paralelo. Una contenía cebadores específicos; la otra contenía el cebador común y otro cebador específico de alelo. Los cebadores utilizados para genotipificar los dos SNP del promotor de IL4R se proporcionan en la Tabla 31 y los cebadores utilizados para genotipificar los dos SNP del promotor de IL13 se proporcionan en la Tabla 32. La amplificación del DNA con un cebador específico de alelo particular indica la presencia del alelo correspondiente. Un aumento de la fluorescencia del SyBr Green indica la acumulación de producto de amplificación. Un experto en la

ES 2 279 916 T3

materia podrá correlacionar el cambio de la fluorescencia con la presencia o ausencia de producto de amplificación, y por lo tanto, la presencia o ausencia del alelo correspondiente.

La amplificación de PCR se realizó en un volumen total de reacción de 100 μ l que contienen los siguientes reactivos:

Volumen (μ l)	Componente
1	Tris 1 M pH 8,0
12	MgCl ₂ 25 mM
1	100X dNTP (dA, dC, dG 50mM; dT 25mM; dU 75mM)
1	20X SYBR Green
1	ROX 200 μ M
2	UNG 1 U/ μ l
2,5	Glicerol al 80%
4	DMSO al 100%
1	primer 1 20 μ M
1	primer 2 20 μ M
1	12 U/ μ l Polimerasa de DNA CEA2 Gold *
2	10 ng/ μ l DNA genómico
hasta 100 μ l	agua estéril

* Desarrollada y elaborada por Roche Molecular Systems. Alternativamente, puede utilizarse 1 μ l de Polimerasa de DNA AmpliTaq Gold, también desarrollada y elaborada por Roche Molecular Systems y comercialmente distribuida por Applied Biosystems, Inc, (Foster City, Calif.)

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp™ PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando el perfil de ciclado de temperatura específico que se muestra a continuación.

2 minutos a 50°C
 Incubación pre-reacción: 12 minutos a 94°C
 50 ciclos: desnaturalización: 20 segundos a 95°C
 hibridación: 20 segundos a 58°C
 Extensión final: 5 minutos a 72°C

Ejemplo 2

Asociación de los SNP de IL4R con la diabetes tipo 1 en familias del HBDI

5 Este ejemplo demuestra la asociación de los SNP de IL4R con la diabetes tipo 1 en familias del HBDI.

La genotipificación de IL4R se realizó en individuos de 282 familias caucásicas escogidas porque tenían dos descendientes afectados de diabetes tipo 1. Los genotipos de IL4R de todos los individuos se determinaron. La genotipificación de IL4R se realizó utilizando un método de genotipificación esencialmente como el que se describe en el
 10 Ejemplo 1. Además de los 564 descendientes (2 hermanos en cada una de las 282 familias) de los pares de hermanos afectados en los que se basa la elección, había otros 26 hijos afectados. Había 270 descendientes no afectados entre estas familias.

Las muestras basadas en las familias se proporcionaron como DNA genómico purificado del Intercambio de Datos
 15 Biológicos Humanos (HBDI), que es un depósito de líneas celulares de familias afectadas por la diabetes tipo 1. Todas las familias del HBDI utilizadas en este estudio son familias nucleares con progenitores no afectados (genéticamente no relacionados) y al menos dos hermanos afectados. Estas muestras se describen además en Noble *et al.*, 1996, Am. J. Hum. Genet. 59:1134-1148.

Es conocido que el genotipo del HLA puede tener un efecto significativo, tanto de aumento como de reducción dependiendo del genotipo, en el riesgo de padecer diabetes tipo 1. En particular, los individuos con el genotipo de HLA DR DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 (denominado DR3/DR4 a continuación) parecen tener el mayor riesgo de padecer diabetes tipo 1 (véase Noble *et al.*, 1996, Am. J. Hum. Genet., 59:1134-1148). Estos individuos de riesgo elevado tienen alrededor de 1 posibilidad entre 15 de estar afectados con diabetes tipo 1. A causa del fuerte efecto de
 25 este genotipo en la probabilidad de la diabetes tipo 1, la presencia del genotipo DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 podría enmascarar la contribución de las variantes alélicas de IL4R.

Los individuos de estas familias también se genotipificaron en los locus de HLA DRB1 y DQB1. De los pares de hermanos afectados, ambos hermanos tenían el genotipo DR3/DR4 en 90 familias. Ninguno de los hermanos afectados
 30 tenía el genotipo DR 3/4 en 144 familias. Exactamente uno de los hermanos afectados tenían el genotipo DR 3/4 en las 48 familias restantes.

Análisis estadístico, métodos y algoritmos

35 Como los ocho SNP de IL4R están tanto físicamente como genéticamente íntimamente ligados el uno al otro, la presencia de un alelo particular en un SNP particular se correlaciona con la presencia de otro alelo particular en un SNP cercano. Esta asociación no aleatoria de dos o más alelos de SNP se conoce como desequilibrio de ligamiento (DL).

40 El desequilibrio de ligamiento entre los ocho SNP de IL4R se evaluó utilizando los genotipos de los 282 pares de progenitores. Estos 564 individuos no están relacionados entre ellos excepto por matrimonio. Un resumen de la frecuencia calculada del alelo salvaje para cada SNP en este grupo de 564 individuos (los “fundadores del HBDI”) se muestra en la Tabla 9.

45 El cálculo del DL puede realizarse de varias formas. se utilizaron dos métodos complementarios para evaluar el DL entre todos los pares de locus de SNP de IL4R. En el primer método, se calcularon los valores de dos medidas distintas pero relacionadas del DL, llamadas D' y D (Devlin y Risch 1995, Genomics, 29(2):311-22), utilizando el algoritmo de estimación de la máxima probabilidad de Hill (Hill, 1974, Heredity, 33(2): 229-39). Los valores de D' y D para todos los pares de SNP de IL4R se muestran en la Tabla 10, en la parte triangular inferior izquierda. Tanto D'
 50 como D pueden tener valores que oscilan entre -1 y +1. Los valores cercanos a +1 o -1 sugieren un fuerte desequilibrio de ligamiento; los valores cercanos a cero indican la ausencia de DL.

Una segunda medida del DL utiliza el método de la prueba de permutación implementado en el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 1995, Mol Biol Evol, 12:921-7, Universidad de Génova, CH) (Slatkin *et al.*, 1996, Heredity, 76:377-
 55 83). Este método maximiza el estadístico cociente de probabilidad ($S = -2\log(L_{H^*}/L_H)$) mediante la permutación de alelos y el recálculo de S en un gran número de iteraciones hasta que S se maximiza. Estas iteraciones permiten la determinación de la distribución nula de S, y por lo tanto la S máxima obtenida puede convertirse en un valor exacto de P (nivel de significación). Estos valores de P se listan en la porción triangular superior derecha de la Tabla 10.

60 La Tabla 10 de DL a pares muestra que existe una evidencia significativa de DL entre los SNP 1 y 2, y entre (todas las combinaciones de) los SNP 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Se conoce que los SNP del 3 al 8 se sitúan dentro de 1200 pares de bases de un único exón (exón 9) del gen de IL4R, y el DL entre estos SNP es evidente también por la pequeña distancia genética.

65 La prueba de la transmisión del desequilibrio (PTD) de Spielman (Spielman y Ewens, 1996, Am J Hum Genet, 59 (5):983-9; Spielman y Ewens, 1998, Am J Hum Genet, 62(2):450-8) se realizó en los datos de genotipo de IL4R de los 282 pares de hermanos afectados (es decir, estructura familiar que consiste en los dos progenitores y los dos hijos afectados). La PTD se utilizó para valorar la asociación de los alelos del individuo de los ocho SNP de IL4R con la

diabetes tipo 1. La PTD evalúa si un alelo se transmite de progenitores heterocigotos a sus hijos afectados con una frecuencia que es significativamente diferente de la esperada por azar. En la hipótesis nula de no asociación de un alelo con la enfermedad, un progenitor heterocigoto transmitirá o no transmitirá un alelo con la misma frecuencia a un hijo afectado. La significación de la desviación de la hipótesis nula puede evaluarse utilizando la prueba estadística de chi-cuadrado de McNemar ($= (T-NT)^2 / (T+NT)$), en la que T es el número observado de transmisiones y NT es el número observado de no transmisiones. La significación (valor P) de la prueba estadística de chi-cuadrado de McNemar es igual al estadístico chi-cuadrado de Pearson con un grado de libertad (Glantz *et al.*, Primer of biostatistics., New York, McGraw Hill Health Professions Division, 1997).

Los resultados de la PTD de los locus individuales de los SNP se muestran en las tablas 11A y 11B. Se utilizó el programa PTD/S-PTD (versión 1.1) de Spielman para realizar el conteo de los alelos transmitidos y no transmitidos (Spielman, McGinnis *et al.*, 1993, Am J Hum Genet, 52(3):506-16; Spielman y Ewens, 1998, *supra*). La Tabla lista las transmisiones observadas del alelo salvaje en cada locus de SNP. Como estos polimorfismos son bialélicos, los conteos de transmisión del alelo variante son iguales a los de no transmisión del alelo salvaje.

Los conteos de las transmisiones y no transmisiones de los alelos a *los casos índice, que sólo* se muestran en la Tabla 11A, no alcanzan una significación estadística, a $\alpha = 0,05$. Sin embargo, es válida para el conteo de los eventos de transmisión a *todos* los hijos afectados. Sin embargo, cuando la PTD se utiliza de este modo (o con este propósito, con más de un hijo por familia), entonces una prueba estadística significativa es evidencia sólo de ligamiento, no de asociación y ligamiento. La Tabla 11B muestra el análisis de PTD cuando se incluyen 26 hijos afectados adicionales. Los resultados que se presentan en la Tabla 11B a continuación muestran que existe una desviación significativa de las frecuencias de transmisión esperadas para los alelos de los SNP 3, 4, 5 y 6. El análisis de los valores de “% de transmisión” para estos SNP indica que el alelo salvaje se transmite a los hijos afectados con frecuencias superiores que la previsión del 50%.

La evidencia de un marcado DL entre los ocho SNP de IL4R sugiere que la transmisión del conjunto ordenado de alelos de cada progenitor a cada hijo afectado en la cohorte del HBDI puede detectarse. Este conjunto ordenado de alelos corresponde físicamente a uno de los dos cromosomas parentales, y se denomina haplotipo. Inferiendo los haplotipos parentales y su transmisión o no transmisión a los hijos afectados, se espera obtener más información estadística que con sólo los alelos.

Los haplotipos se infirieron utilizando una combinación de dos métodos. Como paso inicial, se utilizó el programa Gene Hunter (Falling Rain Genomics, Palo Alto, CA) (Kruglyak, *et al.*, 1996, Am J Hum Genet, 58(6):1347-63) ya que calcula muy rápidamente los haplotipos a partir de los datos de genotipo de los pedigríes. Cada pedigrí familiar del HBDI se analizó entonces de forma individual utilizando el programa Cyrillic (Cherwell Scientific Publishing, Palo Alto, CA), para resolver cualquier adjudicación de haplotipo ambigua o no fundamentada. Los haplotipos no ambiguos y no recombinantes pudieron asignarse con certeza en todas excepto en 6 de las 282 familias. Los datos de los haplotipos de estas 276 familias se utilizaron en el subsiguiente análisis de datos.

El gen de IL4R tiene la propiedad de que muchos de sus SNP se sitúan en el exón más a 3' (exón 9), cuya región codificante es de aproximadamente 1,5 Kb de longitud. Se desarrolló un método para la haplotipificación directa de hasta cinco de estos alelos del exón 9 (es decir, los SNP nº 3-7) sin necesidad de los genotipos parentales. Muchos de estos SNP resultan en cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína IL4R, por lo que diferentes haplotipos codifican diferentes proteínas con posiblemente diferentes funciones.

Los haplotipos, en un individuo del que no se posee información genotípica parental, pueden inferirse de forma no ambigua sólo cuando un máximo de uno de los lugares de estos SNP es heterocigoto. En otros casos, la ambigüedad puede resolverse de forma experimental.

Se utilizaron dos cebadores específicos de alelo con un cebador en común para realizar las reacciones de PCR (utilizando la polimerasa Stoffel Gold™) para amplificar separadamente el DNA de cada cromosoma, como se muestra en la Figura 1 a continuación. Los alelos de cada amplicón se detectaron entonces mediante el mismo procedimiento de hibridación de tiras, y los alelos ligados se obtuvieron directamente. La elección de cebadores específicos de alelo (flechas coloreadas o sombreadas) y comunes (flechas negras) depende de cuales locus de SNP son heterocigotos. Los cebadores se modificaron en el fosfato 5' mediante la conjugación de biotina, y se muestran en la Tabla 12 (ID. de SEC. Nº: 54-62).

En cada ensayo de haplotipificación, se prepararon dos reacciones de PCR para cada DNA a analizar. Una reacción contenía el cebador común y el cebador específico del alelo salvaje, la otra contenía el cebador común y el cebador específico del alelo variante. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de reacción de 50-100 µl que contenían los siguientes reactivos:

0,2 ng/µl de DNA genómico humano purificado

0,2 mM de cada cebador

800 mM dNTP total (200 mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

10 mM KCl

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

2,5 mM MgCl₂,

0,12 unidades/ml polimerasa de DNA Stoffel Gold™*

* desarrollada y elaborada por Roche Molecular Systems.

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp™ PCR System 9600 (PE Biosystems, Foster City, CA), utilizando el perfil de ciclado de temperaturas específico que se muestra a continuación.

Incubación pre-reacción: 94°C durante 12,5 minutos

33 ciclos: desnaturalización: 95°C durante 45 segundos

hibridación: 64°C durante 30 segundos

extensión: 72°C durante 45 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Mantenimiento: 10°C - 15°C

Tras la amplificación, cada producto de reacción de PCR se desnaturalizó y se utilizó separadamente para la hibridación con las sondas unidas a membrana como se ha descrito anteriormente.

Coincidencia de haplotipos en hermanos afectados

La evidencia del ligamiento de IL4R a la diabetes tipo 1 (opuesto a asociación) puede valorarse mediante el método de coincidencia de haplotipos. Este método evalúa la distribución en todas las familias del número de cromosomas que son idénticos por descendencia (IPD) entre los dos hermanos afectados en cada familia. Por ejemplo, en una familia, el padre transmite el mismo de sus dos haplotipos de IL4R a ambos hijos, y la madre transmite el mismo de sus dos haplotipos de IL4R a ambos hijos, entonces se dice que los hijos comparten dos cromosomas IPD (o, son IPD = 2). Si ambos progenitores transmiten haplotipos de IL4R diferentes a sus dos hijos, se dice que los hijos son IPD = 0.

Bajo la hipótesis nula de no ligamiento de IL4R a la diabetes tipo 1, la proporción de familias IBD = 0 es del 25%, de IBD = 1 es del 50% y de IBD = 2 es del 25%, como se espera por una distribución al azar (véase Tabla 13). La evidencia de una diferencia estadísticamente significativa de esta expectativa puede valorarse utilizando el estadístico de chi-cuadrado.

Los valores de identidad por descendencia (IPD) de los haplotipos parentales de IL4R en los hermanos afectados pudieron determinarse de forma no ambigua en 256 familias. En el resto de familias, uno o ambos progenitores eran homocigotos y/o el origen paterno de los cromosomas de los hijos no pudo determinarse. La distribución de la IPD se muestra en la Tabla 13.

Es conocido que el genotipo del HLA puede tener un efecto significativo, tanto un aumento como una reducción en función del genotipo, sobre el riesgo de padecer diabetes tipo 1. En particular, los individuos con el genotipo de HLA-DR DR3-DQB1*0201/DR4-DBQ1*0302 (denominados DR3/4 a continuación) parecen tener el mayor riesgo de padecer diabetes tipo 1 (véase Noble, Valdes *et al.*, 1996), incorporado aquí como referencia). Estos individuos con riesgo elevado tienen alrededor de 1 posibilidad entre 15 de estar afectados de diabetes tipo 1. A causa del potente efecto de este genotipo en la probabilidad de padecer diabetes tipo 1, la presencia del genotipo DR3/4 podría enmascarar la contribución de los alelos o haplotipos de IL4R.

La distribución de la IPD en las familias se estratificó en dos grupos basados en el genotipo DR3/4 de los hijos. El primer grupo contiene a las familias en las que uno o ambos de los hermanos son DR3/4 ("uno/ambos hermanos DR3/4", n = 119). El segundo grupo contiene a las familias en las que ningún hijo es DR3/4 ("ningún hermano DR3/4", n = 137). La distribución de IPD en estos subgrupos se muestra en la Tabla 13. No existía una diferencia estadísticamente significativa de la distribución esperada de la coincidencia de IPD en el subgrupo de familias de "uno/ambos hermanos DR3/4". Existe una diferencia estadísticamente significativa de la distribución esperada de la coincidencia de IPD en el subgrupo de familias de "ningún hermano DR3/4" (Tabla 13). Esto indica que existe una evidencia de ligamiento del locus de IL4R con la DMID en las familias de "ningún hermano DR3/4".

Asociación mediante CDFA

La asociación de los haplotipos de IL4R con la diabetes tipo 1 se evaluó utilizando el método de CDFA (Control dentro de la familia afectada) (Thomson G., 1995, Am J Hum Genet 57:487-98). Brevemente, se comparan dos grupos

de haplotipos, y las frecuencias de los haplotipos en los grupos, entre ellos como en un sistema de muestreo de caso/control. Estos dos grupos son los haplotipos caso (transmitidos) y los control (CDFA).

Los haplotipos caso, es decir los transmitidos a los hijos afectados, se registraron y contaron como sigue. Para cada par de hermanos, se contaron los cuatro cromosomas transmitidos, independientemente del estado de los progenitores (homocigotos o heterocigotos). Sin embargo, los haplotipos en los dos hermanos de un par no son independientes el uno del otro. La forma de realizar una enumeración estadísticamente conservadora y válida es dividiendo todos los conteos entre dos.

Los haplotipos control (CDFA) son aquellos que nunca se transmiten al par de hijos afectados (Thomson, 1995). Los haplotipos CDFA permiten una estimación no sesgada de las frecuencias de los haplotipos control. Los CDFA sólo pueden determinarse a partir de progenitores heterocigotos, y además, sólo cuando el progenitor transmite un haplotipo a ambos hijos; el otro haplotipo que no se transmite se cuenta en la población CDFA. La población CDFA sirve como un conjunto bien emparejado de haplotipos control para el estudio.

La Tabla 14A muestra la comparación de las frecuencias transmitidas y CDFA para todos los haplotipos del HBDI que se observaron al menos cinco veces en el conjunto de muestras completo. Cada fila representa los datos del haplotipo de un individuo. Sin embargo, aunque se observaron 16 haplotipos distintos en el conjunto de datos de HBDI, algunos aparecían muy raramente. Los siete haplotipos más infrecuentes se agruparon juntos en la fila "otros". Cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Un "1" indica la presencia del alelo de referencia, un "2" la presencia del alelo variante para cada SNP. El alelo de "referencia" para cada SNP es el que está presente en GenBank nº de acceso X52425.1 como se describe en la Tabla 6.

Las Tablas 14B y 14C muestran la comparación de las frecuencias de transmitidos y CDFA para todos los haplotipos del HBDI observados en los subgrupos de familias de "uno/ambos hermanos DR3/4" y de "ningún hermano DR3/4", respectivamente. Estas tablas muestran que la estratificación de las familias basada en el genotipo DR3/4 de los hijos permite la identificación de haplotipos que están asociados con la DMID. En particular, en el subgrupo de "ningún hermano DR3/4" un haplotipo (identificado como "2 1 2 2 2 2 1") está significativamente poco representado en el conjunto de cromosomas transmitidos ($P < 0,005$).

A partir de la información de las frecuencias de los haplotipos transmitidos y CDFA en las Tablas 14B y 14C, pueden derivarse mediante conteo las frecuencias de los alelos transmitidos y CDFA. El análisis de CDFA locus por locus se muestra en las Tablas 15A y 15B.

Los datos presentes en las Tablas 15A y 15B muestran que existe una evidencia estadísticamente significativa, en el subgrupo de familias de "ningún hermano DR3/4", de que los alelos de los SNP número 3, 4, 5, 6 y 7 están asociados con la DMID. La evidencia de la asociación es especialmente fuerte en el SNP nº 6. En el subgrupo "uno/ambos hermanos DR3/4", existe la misma tendencia de asociación alélica, aunque la tendencia no alcanza la significación estadística.

Asociación mediante PTD basada en los haplotipos

El análisis de PTD puede utilizarse para la determinación de la transmisión (o no transmisión) del haplotipo de 8 locus a partir de los progenitores de los hijos afectados, una vez se han inferido o asignado los haplotipos mediante métodos moleculares. Las tablas 16A, B, y C resumen los resultados de la PTD de las familias del HBDI. Cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Un "1" indica la presencia del alelo de referencia, un "2" la presencia del alelo variante para cada SNP. El alelo de "referencia" para cada SNP es el que está presente en GenBank nº de acceso X52425.1 como se describe en la Tabla 6. La Tabla 16A muestra el conteo de los sucesos de transmisión informativa sólo a un hijo (el caso índice) por familia, la Tabla 16B muestra el conteo de las transmisiones informativas a los dos hijos primarios afectados por familia, y la Tabla 16C muestra el conteo de las transmisiones informativas a todos los hijos afectados. Los resultados de la PTD del haplotipo de 8 locus alcanzan la significación estadística cuando se incluyen todos los hijos afectados (2 o más por familia).

Los análisis de PTD pueden realizarse en las familias tras la estratificación de los hijos mediante el genotipo DR3/4. El resumen de los conteos de las transmisiones informativas a los dos hijos primarios afectados por familia, en los subgrupos de familias de "uno/ambos hermanos DR3/4" y de "ningún hermano DR3/4", se muestra en las Tablas 17A y 17B respectivamente. Cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Un "1" indica la presencia del alelo de referencia, un "2" la presencia del alelo variante para cada SNP. El alelo de "referencia" para cada SNP es el que está presente en GenBank nº de acceso X52425.1 como se describe en la Tabla 6.

Como se ha presentado anteriormente, existe una evidencia significativa de ligamiento de la DMID al IL4R en el subgrupo de "ningún hermano DR3/4".

Los datos de la Tabla 17B indican que existe una evidencia significativa de asociación de los haplotipos de IL4R a la DMID, en presencia de este ligamiento. En particular, en el subgrupo de "ningún hermano DR3/4" un haplotipo (denominado "2 1 2 2 2 2 1") está significativamente poco transmitido a los hijos afectados.

Ejemplo 3

Asociación de IL4R con la diabetes tipo 1 en muestras de filipinos

Este ejemplo demuestra la asociación de los SNP de IL4R con la diabetes tipo 1 en una población filipina.

Como se utiliza en esta sección, “pacientes” se refiere a individuos con la enfermedad, es decir individuos con diabetes tipo 1 y “controles” se refiere a individuos normales, aquellos sin la enfermedad.

Se seleccionaron 90 pacientes (n = 90) para este estudio de entre la población filipina. Los pacientes incluidos en el estudio estaban afectados por la diabetes tipo 1 como se define mediante la reciente clasificación ADA (comité de expertos en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus, 1997). Los pacientes nacieron en Filipinas y todos ellos tienen progenitores filipinos. En estos pacientes se han caracterizado los niveles de péptido C inferiores a 0,3 mmol/l y los autoanticuerpos contra autoantígenos de las células de los islotes (Medici *et al.*, 1999, Diabetes Care, 9: 1458-62). También se recogieron muestras de 94 sujetos normales filipinos sin historia familiar de diabetes. Este fue el grupo control. Todos los pacientes y controles eran de la región del sur de Filipinas, Luzon. El estudio fue aprobado por el comité ético local y se recogió un consentimiento informado de los pacientes. Además, se utilizaron muestras independientes de un estudio previo del locus de HLA clase II en filipinos (Bugawan *et al.*, 1994, Genetics, 54:331-340) con origen en la misma región, tras una prueba estadística de heterogeneidad, para complementar las muestras control. Estas comprenden un total de 194 cromosomas obtenidos de muestras familiares e individuales.

Los individuos se genotipificaron como se ha descrito anteriormente. Los genotipos de los individuos afectados y no afectados se muestran en la Tabla 4 (ID. de SEC. N°: 20-24). Tanto los números reales como las frecuencias se proporcionan para cada genotipo. Los datos (Tabla 5) confirman la presencia de una asociación de las variantes de los SNP de IL4R con la diabetes tipo 1.

Métodos estadísticos y algoritmos

Las frecuencias de los alelos y haplotipos entre grupos se compararon utilizando la prueba z. Las composiciones de haplotipos y las frecuencias se estimaron a partir de los datos de genotipos utilizando el algoritmo EM del programa Arlequin (L. Excoffier, Universidad de Genova, CH) (Excoffier *et al.*, 1995, Mol Biol Evol, 12:921-7; Slatkin *et al.*, 1996, Heredity, 76:377-83).

Resultados

Las frecuencias del alelo salvaje para cada uno de los ocho SNP de IL4R en los grupos filipinos control y diabéticos se muestran en la Tabla 18. La Tabla 18 proporciona la evidencia de que las frecuencias alélicas de los SNP n° 3 y 4 son significativamente diferentes entre los dos grupos, y sugiere una asociación con la DMID.

También es posible inferir y construir los haplotipos multi-locus de IL4R en los sujetos filipinos, ya sea informáticamente mediante una estimación de máxima verosimilitud (EMV), o bien utilizando los métodos de haplotipificación molecular descritos previamente.

La Tabla 19 lista los cinco haplotipos más frecuentes estimados informáticamente y sus frecuencias en los diabéticos y controles filipinos, y presenta la significación de las diferencias en las frecuencias. Cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Un “1” indica la presencia del alelo de referencia, un “2” la presencia del alelo variante para cada SNP. El alelo de “referencia” para cada SNP es el que está presente en GenBank n° de acceso X52425.1 como se describe en la Tabla 6.

La Tabla 20 lista los haplotipos observados como se deriva e infiere mediante haplotipificación molecular; se compilan los haplotipos de siete locus no ambiguos (no se muestran los alelos del SNP n° 1, como se indica con la “x”). Cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Un “1” indica la presencia del alelo de referencia, un “2” la presencia del alelo variante para cada SNP. El alelo de “referencia” para cada SNP es el que está presente en GenBank n° de acceso X52425.1 como se describe en la Tabla 6. Las Tablas 18 y 19 proporcionan evidencia de una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de uno o más haplotipos entre las poblaciones filipinas control y diabética, y apoya la presencia de una asociación de IL4R con la DMID. En particular, un haplotipo (que se indica “x 1 2 2 2 2 2 1”) está significativamente poco representado en el grupo de diabéticos filipinos.

Ejemplo 4

Asociación de los SNP de IL4R, IL4 e IL13 con la diabetes tipo 1 en muestras de filipinos

Este ejemplo demuestra la asociación de los SNP de IL4R, IL4 e IL13 con la diabetes tipo 1 en la misma población filipina descrita anteriormente en el Ejemplo 3.

Como se utiliza en esta sección, “pacientes” se refiere a individuos con la enfermedad, es decir individuos con diabetes tipo 1 y “controles” se refiere a individuos normales, aquellos sin la enfermedad.

Los individuos se genotipificaron como se ha descrito anteriormente.

SNP individuales

Las distribuciones de alelos de los SNP individuales en el locus de IL4R ($n = 10$), el locus de IL4 ($n = 1$) y el locus de IL13 ($n = 4$) entre los pacientes y los controles se muestran en la Tabla 21. Los patrones de desequilibrio de ligamiento se estimaron utilizando aproximaciones de máxima verosimilitud a partir de los datos de los genotipos individuales de individuos no relacionados (Slatkin y Excoffier, 1996 *Heredity* 76:377-383). Los patrones de desequilibrio de ligamiento (DL) a pares para estos SNP inferidos entre la población control se muestran en la Tablas 22 y 23. Entre los SNP de IL4R individuales, tres (E375A, L389L, y C406R) mostraron asociación nominalmente significativa con la diabetes tipo 1 mientras que el alelo variante de dos SNP adicionales (I50V, $p = 0,062$ y S478G, $p = 0,064$) se encontraba reducido entre los pacientes (Tabla 21).

Los dos SNP del promotor no se encontraron significativamente asociados con la diabetes tipo 1, aunque el alelo variante del SNP-3223 se encontraba ligeramente aumentado en pacientes ($CP = 1,45$, $p = 0,10$). Con la excepción de este SNP del promotor y del SNP 150 V, con el que está en fuerte DL, el alelo variante en cada SNP se encontró con una baja representación entre los pacientes. Algunos de los residuos de aminoácido polimórficos en esta cadena parecen ser biológicamente importantes y afectan a la señalización del receptor de IL-4 (Kruse *et al.*, 1999, *Immunology*, 96:365-71).

De los 10 SNP de IL4R tipificados, el SNP L389L mostró la mayor asociación con la diabetes tipo 1 en esta población, con frecuencias significativamente menores entre los pacientes que entre los controles ($CP = 0,34$; $p = 0,001$). Sin querer suscribir una teoría, se cree que a causa de que es un polimorfismo silente (sinónimo), es improbable que este SNP sea responsable del efecto protector observado de padecer la diabetes tipo 1. Este SNP se encuentra en un potente DL (Tabla 22) con los SNP no sinónimos flanqueantes (E375A, C406R, S478P y Q551R) y todos estos SNP muestran una tendencia a la protección (asociación negativa). El SNP L389L también se encuentra en un potente DL negativo con el SNP del promotor -3223 (Tabla 22).

En la comparación de genotipos en los SNP individuales de IL4R (Tabla 24), el efecto protector es dominante ya que el heterocigoto del 389 de IL4R muestra un $CP = 0,29$. Entre los SNP individuales del cromosoma 5q31, sólo los alelos variantes en los dos SNP del promotor de IL13 se encontraban aumentados entre los pacientes ($CP = 1,58$ y $p = 0,05$ para -1512, y $CP = 1,49$ y $p = 0,12$ para -1112) (Tabla 21). Si se comparan las frecuencias de genotipo, sin embargo, R110Q de IL13 mostró una asociación nominalmente significativa en esta población ($p = 0,03$; Tabla 24). Estos datos sugieren que el homocigoto variante, pero no el heterocigoto, puede tener un riesgo aumentado de padecer diabetes tipo 1. En la Tabla 24, cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Las letras se refieren al alelo real (nucleótido) presente, como se describe en la Tabla 6.

Haplotipos

IL4R

Los haplotipos de IL4R se estimaron en base al método de maximizado de expectativa (ME) (Excoffier *et al.*, 1995, *Mol. Biol. Evol.*, 12:921-927.) y se determinaron directamente mediante métodos moleculares de haplotipificación, descritos en el Ejemplo 4. El método molecular de haplotipificación permitió la asignación no ambigua de fase para 7 SNP de IL4R (C676T, A1374C, G1417T, T1466C, T1682C, A1902G y T2531C). Utilizando la haplotipificación molecular de estos 7 SNP, se determinaron 7 haplotipos diferentes de IL4R en esta población y sus frecuencias entre los pacientes y los controles se compararon (Tabla 25A).

En Tabla 25A cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8) presentes en cada uno de los ocho SNP de IL4R como se describe en la Tabla 6. Las letras se refieren al alelo real (nucleótido) presente, como se describe en la Tabla 6.

Un haplotipo específico (CCTCCGT) se encontró significativamente poco representado entre los pacientes ($CP = 0,4$, $p = 0,013$). Este mismo haplotipo también se encontró que era protector (asociación negativa significativa), mediante los métodos de PTD, en las familias del HBDI, como se describe en el Ejemplo 2. Este efecto protector por lo tanto se ha observado en dos poblaciones diferentes y en dos diseños de estudio diferentes, es decir caso/ control (filipinos) y PTD, además de que con estos SNP es biológicamente plausible (es decir, consecuencias funcionales). Esto apunta claramente que las variantes de la molécula del IL4R tienen influencia en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1. En particular, este haplotipo específico de IL4R parece conferir un efecto protector dominante.

En las familias del HBDI, la estratificación basada en el genotipo del HLA de mayor riesgo (HLA-DRB1*0301-DQB1*0201/HLA-DRB1*04-DQB1*0302) fue necesaria para demostrar el efecto protector del haplotipo IL4R. Se encontró una asociación negativa significativa sólo entre aquellas familias en las que ningún hermano afectado era DR3/4, presumiblemente porque el efecto del polimorfismo de IL4R era relativamente modesto comparado con el riesgo conferido por este genotipo de HLA de alto riesgo, que confiere un riesgo de padecer la enfermedad mayor que el de los homocigotos DR3/3 o DR4/4. Entre los filipinos, se observó un efecto protector significativo de un haplotipo específico de IL4R sin estratificación (Tabla 25). Sin querer suscribir una teoría, esto podría reflejar la ausencia entre los filipinos de un aumento del riesgo asociado con DR3/4 en relación con los genotipos DR3/3 o DR4/4. La ausencia

del “efecto DR3/4”, bien establecida por varios estudios de la diabetes tipo en caucásicos, puede atribuirse entre los filipinos a los diferentes patrones de desequilibrio de ligamiento de los alelos DQB1 con los alelos DRB1*04 entre asiáticos y caucásicos.

La aproximación de haplotipificación molecular utilizada en este ejemplo no asignó la fase de los dos SNP del promotor y del SNP 150V en el locus de IL4R. En consecuencia, se utilizó la aproximación de ME para estimar las frecuencias de los haplotipos de 10 SNP para estos 3 SNP individuales y los haplotipos de 7 SNP previamente determinados mediante métodos moleculares (Tabla 25B). En la Tabla 25B, cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos (es decir, de los SNP 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10) presentes en cada uno de los diez SNP de IL4R descritos en la Tabla 21 (SNP en orden: C(-3223)T - C(-1914)T - 150V - N142N E375A - L389L - C406R - S478P - Q551R - S761P). Las letras se refieren al alelo real (nucleótido) presente, como se describe en la Tabla 21.

De los 17 haplotipos de 10 SNP con una frecuencia estimada >1%, en algún grupo, sólo un haplotipo de 10 SNP que contiene el haplotipo de 7 SNP protector (H5A o CCACCTCCGT) apareció con una fuerte asociación negativa (CP = 0,0; IC 95% [0-0,5]; p = 0,001) con la enfermedad. De forma interesante, el otro haplotipo que contenía el mismo haplotipo de 7 SNP (H5B o CTA-CCTCCGT) no se encontró significativamente asociado con la enfermedad (CP = 0,66, p = 0,33). Esto sugiere que una combinación específica de SNP del promotor de IL4R con una variante de la secuencia codificante particular contribuye al riesgo de padecer diabetes tipo 1.

IL4 e IL13

Los SNP de IL4 y de IL13 están en un fuerte DL (Tabla 23). Las frecuencias estimadas de estos haplotipos de 5 SNP se compararon entre pacientes y controles (Tabla 26). En la Tabla 26, cada haplotipo se lista mediante el conjunto ordenado de alelos presentes en el SNP de IL4 y los cuatro SNP de IL13 descritos en la Tabla 21. El orden es C(-524)T de IL4 - A(-1512)C de IL13 - C(-1112)T de IL13 - intrón 3 de IL13 - R110Q de IL13. Las letras se refieren al alelo real (nucleótido) presente, como se describe en la Tabla 21.

Las distribuciones generales fueron diferentes (p = 0,005) y un haplotipo, TCTTA, se encontró fuertemente asociado con la diabetes tipo 1 (CP = 3,47, p = 0,004). Otros dos haplotipos mostraron una asociación nominalmente significativa (p = 0,02 y 0,03). Una observación sorprendente fue que el haplotipo de IL13 CTTA pareció estar asociado con la enfermedad sólo en combinación con el alelo T en el SNP-524 del promotor de IL4 ya que el haplotipo CCTTA no mostró asociación a la enfermedad.

Estos datos podrían reflejar DL entre el haplotipo de 5 SNP asociado con algún gen cercano causal o sugiere que una combinación particular de una variante del promotor de IL4 y variantes del promotor y codificantes de IL13 son responsables de un riesgo elevado de padecer diabetes tipo 1 (interacción gen-gen).

Ejemplo 7

Dependencia del riesgo de padecer diabetes tipo 1 conferida por los SNP de IL4R del genotipo de IL4 e IL13 en muestras de filipinos: evidencia de epistasis

Este ejemplo demuestra epistasis, la interacción entre SNP del locus IL4R en el cromosoma 16 y aquellos en los locus de IL4 e IL13 en el cromosoma 5.

Como tanto IL4 como IL13 son ligandos de un receptor compuesto, en parte, de la cadena alfa IL4R, existe una posibilidad de que existan interacciones gen-gen entre polimorfismos en el locus de IL4R en el cromosoma 16p11 y los cinco SNP en los locus de IL4 e IL13 en el cromosoma 5q31. En una aproximación se examinó la independencia estadística de los genotipos en los 10 SNP de IL4R y los genotipos de cada uno de los SNP de IL4 e IL13 (Tabla 27). Se evaluaron las interacciones gen por gen en los SNP en diferentes genes valorando si las frecuencias de los genotipos en los locus no ligados eran independientes (es decir, los SNP de IL13 e IL4 en el cromosoma 5 y los SNP de IL4R en el cromosoma 16) entre los pacientes. Estos análisis se realizaron en cada par de SNP no ligados mediante una prueba de chi-cuadrado en tablas de contingencia con marginales definidos por los contajes de genotipo en pacientes o en controles. Los valores de chi-cuadrado y los correspondientes grados de libertad para cada comparación de los SNP de IL4R se sumaron y se computaron los valores p de la suma de chi-cuadrados.

No se encontró una desviación de la independencia de estos SNP entre controles pero se observó una desviación significativa de los SNP-524 del promotor de IL4 (p = 0,001) y SNP del intrón 3 de IL13 (p = 0,019) entre pacientes.

Para valorar si el efecto sobre la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 debido a los SNP de IL4R era modificada por los SNP de IL4 o IL13, se realizó un modelo de epistasis utilizando un modelo de regresión logística (véase a continuación). Para cada uno de los cinco SNP de IL4 e IL13, se testó si el efecto de los genotipos de los SNP de IL4R combinados sobre la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 era diferente en función de los SNP de IL4 e IL13. Los resultados (Tabla 28) indican que sí existe una interacción epistática entre los genotipos de IL4R y los genotipos de IL4 e IL13. Para efectuar las comparaciones múltiples, se realizó un análisis de permutación de esta prueba. En 22/200 permutaciones uno o más de las pruebas de 5 SNP mostraron una p < 0,035, en 13/200 uno o más de las pruebas de los SNP mostraron una p < 0,035 y otro mostró una p < 0,075. En 9/200 uno o más de las pruebas de 5 SNP mostró una p < 0,035, otro mostró una p < 0,075 y otro mostró una p < 0,135. Por lo tanto, el patrón observado en la Tabla 28 tiene una probabilidad de p < 0,045. La conclusión que se deriva es que la interacción epistática observada entre los de SNP

IL4 e IL13 y los genotipos de IL4R es estadísticamente significativa lo que indica que, en este conjunto de datos, los genotipos en la región de IL4, IL13 afectan la susceptibilidad genética a la diabetes tipo 1 conferida por IL4R.

Para ilustrar esta interacción, también se calcularon los cocientes de probabilidades para los SNP individuales de IL4R como una función del genotipo de los SNP de IL4 e IL13. Las diferencias entre los cocientes de probabilidades fueron superiores para el SNP de IL4R-3223 y los cuatro SNP de IL13. En la Figura 2 se muestran los cocientes de probabilidades con los intervalos de confianza del 95% y los valores p de los análisis de las tablas de contingencia estratificadas. La Figura 2 muestra los cocientes de probabilidades, los contajes de pacientes y controles de los genotipos específicos de IL4R, IL4 e IL13. La Figura 2A muestra la interacción de Ala375Glu de IL4R con -524 de IL4 (promotor). La Figura 2B muestra la interacción de Gln551Arg de IL4R con A-1512C de IL13. La Figura 2C muestra la interacción entre C-3223T de IL4R y A-1512C de IL13, y la Figura 2D muestra la interacción entre C-3223T de IL4R y C-1112T de IL13. El valor p de la asociación de cada combinación de genotipos se muestra sobre cada barra de cociente de probabilidades.

La observación más sorprendente fue que el genotipo CT en el SNP-3223 de IL4R tenía un CP de 8,55 (IC 95% = 1,05, 69,8) si se encontraba presente con el genotipo TT del -1112 de IL13, y un CP = 0,53 (IC 95% = 0,29, 0,98) si se encontraba presente con el genotipo CC. Sin suscribir teoría alguna, la observación de una interacción entre polimorfismos en los genes IL13 e IL4 y polimorfismos en el gen que codifica el receptor para los productos de estos dos genes representa una hipótesis interesante y biológicamente plausible que, dadas las comparaciones múltiples, requiere de un posterior estudio. Un estudio recientemente publicado sobre pacientes de asma informaba de una interacción gen-gen entre IL4R e IL13 en la determinación de los niveles de IgE en suero (Howard *et al.*, 2002, Am J Hum Genet, 70:230-6).

Como se ha descrito anteriormente, los datos de asociación de IL4R obtenidos en este estudio de caso control en filipinos indica que el haplotipo de 7 SNP, compuesto primariamente por alelos variantes en estos SNP, confiere una protección dominante frente a la diabetes tipo 1 (Tabla 25A), que es consistente con nuestras observaciones recientes, basadas en la PTD y análisis de CDFA en un conjunto de múltiples familias caucásicas (del registro HBDI). La repetición de esta observación en dos poblaciones diferentes y en dos diseños de estudio diferentes aumenta el valor de esta inferencia. El análisis de haplotipos de 10 SNP de IL4R entre los filipinos sugiere que una variante del promotor específica en combinación con variantes de secuencia codificante específicas puede ser responsable de la protección observada (Tabla 25B). Varios estudios recientes han mostrado que el alelo de referencia o salvaje en varios de estos SNP de IL4R está asociado con el asma atópico y con un aumento de los niveles de IgE (Howard *et al.*, 2002, Am J Hum Genet, 70:230-6, Sandford *et al.*, 2000, J Allergy Clin Immunol, 106:135-40). Por los tanto, parece que los mismos alelos en los SNP de IL4R confieren un aumento del riesgo de una enfermedad básicamente Th1 (diabetes tipo 1) y una Th2 (asma atópico). Sin suscribir teoría alguna, estas asociaciones no apoyan un efecto sobre el equilibrio Th1/Th2 mediado por el polimorfismos en el gen de IL4R, sino que sugieren que este polimorfismo puede influenciar algún aspecto de la regulación inmune y la homeostasis en las vías Th1 y Th2, y posiblemente, la activación de las células B. Posiblemente, los patrones observados de asociación de la enfermedad reflejan el efecto de los polimorfismos de IL4R en el equilibrio entre la activación de las células Th1 y Th2 y la de las células T reguladoras. En conclusión, la importancia del riesgo de padecer diabetes tipo 1 puede determinarse mediante combinaciones específicas de variantes en el locus de IL4R y en los genes que codifican sus dos ligandos, IL4 e IL13.

Cálculos realizados para conseguir los resultados de la Tabla 28

Para cada SNP de IL4R, al genotipo homocigoto con el mayor cociente de probabilidades se le otorga el valor de 2, al heterocigoto se le otorga el valor de 1 y al otro homocigoto 0. Se realizó una regresión logística en nueve polimorfismos de IL4R (S761P no mostró la variante) de este modo y se derivó una nueva variable numérica "il4r" mediante:

$$il4r = \alpha_1 G_{-3223} + \alpha_2 G_{-1914} + \alpha_3 G_{50} + \alpha_4 G_{142} + \alpha_5 G_{375} + \alpha_6 G_{389} + \alpha_7 G_{406} + \alpha_8 G_{478} + \alpha_9 G_{551}$$

en la que G_i indica el genotipo (0, 1 o 2) en la posición i y α_j indica el coeficiente ajustado mediante regresión logística.

Los coeficientes ajustados mediante regresión fueron $\alpha_1 = 0,368$; $\alpha_2 = 0,053$; $\alpha_3 = 0,37$; $\alpha_4 = 0,061$; $\alpha_5 = 0,66$; $\alpha_6 = 1,08$; $\alpha_7 = 0,57$; $\alpha_8 = 0,54$ y $\alpha_9 = 0,22$. entonces se comprobó la epistasis de forma independiente para cada uno de los cinco SNP del cromosoma 5 ajustando el siguiente modelo de regresión logística:

$$P(T1DM) = \exp(X)/(1 + \exp(X)),$$

en el que

$$X = C + \beta_1 il4r + \beta_2 G_{cr5i} + \beta_3 (il4r \cdot G_{cr5i})$$

y G_{cr5i} es el genotipo de uno de los SNP del cromosoma 5 (valores 0, 1 o 2).

Análisis de permutación

Como se comparan cinco SNP diferentes, es importante corregir las múltiples pruebas. Sin embargo, una corrección de Bonferroni o Dunn-Sidak no era apropiada ya que los SNP de IL4 e IL13 no son independientes (véase Tabla 23). Por lo tanto el análisis de permutación se realizó manteniendo constantes las frecuencias del genotipo de paciente y control, y permutando los genotipos de IL4 e IL13 y los genotipos de IL4R de los grupos de pacientes y los grupos de control de forma separada.

De esta forma, sólo se analizó la interacción epistática entre las dos regiones genéticas y no las asociaciones genéticas individuales de IL4 o IL13 e IL4R. se realizaron 200 permutaciones en la prueba de epistasis en los cinco SNP del cromosoma 5 cada vez. Los análisis se realizaron utilizando S-Plus versión 6.0 Profesional (Insightful Corporation).

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Las descripciones y Ejemplos pretenden ser ilustrativos de la invención y no limitantes.

TABLA 3

Variante	Sonda	Secuencia de la sonda	ID de SEC. n°:	Título (µl)
A398	DBM0081P	CCACACGTGTATCCCTGAGAA	3	1,0
398G	DBM0082P	TCTCAGGGACACACGTGTG	4	4,0
C676	DBM0172P	TGGAGTGAAAACGACCCGGCAG	5	1,0
676T	DBM0073P	CTGCCGGGTCAATTTTCGCTCC	6	1,0
A1374	DBM0043RC	GAGGGAAGGGAGGGCATTGTG	7	1,0
1374C	DBM0139P	AGGGAAGGGCGGGCATTGT	8	4,0
G1417	DBM0124P	CTCTCCGAGCAGGTCCAGG	9	1,0
1417T	DBM0046RC	TCCTGGACCTTCTCGGAGAGG	10	1,0
T1466	DBM0076P	AAGGTGGAAGAAGGCATGACTCC	11	1,0
	DBM0132P	AAGGTGGGAGAAGACATGACTCC	12	1,0
1466C	DBM0171P	GGAGTCACGTCTTCTCCTACCTT	13	2,0
T1682	DBM0157P	TGGCTCAGAGAGTTGCTGAAGC	14	2,0
1682C	DBM0094P	TTCAGCAACCCCCTGAGCC	15	2,0
A1902	KW86	AGTGGCTATCAGGAGTTTGT	16	1,6
1902G	KW85	AGTGGCTATCGGGAGTTTGT	17	0,8
T2531	DBM0080P	CTCTTCTCTGAGATGCCCGAG	18	0,5
2531C	DBM0048RC	CTCGGGCATCCCAGAGAAGAG	19	0,5

	ID de SEC. n°:		frec. EMV	frec. EMV	CP	Contaje: control	Contaje: diabético- cos	Total	exp control	exp dia- béticos	chi- cuadrado	valor P
haplotipo		marcaje										
ACATTTAT	20	H-1	0,318	0,329	1,1	59,7	58,5	118,2	60,7	57,5	0,033	0,855
ACAGTTGT	21	H-6	0,074	0,074	1,0	14,0	13,2	27,2	14,0	13,2	0,000	0,987
ACCTCCGT	22	H-3	0,145	0,058	0,4	27,3	10,3	37,6	19,3	18,3	6,727	0,009
GCAGTTAT	23	H-2	0,390	0,441	1,2	73,3	78,5	151,8	78,0	73,8	0,582	0,445
GCCGCCGT	24	H-10	0,032	0,051	1,6	6,0	9,0	15,0	7,7	7,3	0,776	0,378
n=		188	178					366				
										total	8,118	0,0987

Tabla 4: Frecuencias de haplotipo estimadas informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos.

ES 2 279 916 T3

TABLA 5

SNP	Genotipos Afectados (n=89)			Genotipos Control (n=94)		
A398G (50 I/V)	AA=21 (0,236)	AG=40 (0,449)	GG=28 (0,315)	AA=32 (0,340)	AG=41 (0,436)	GG=21 (0,223)
C676G (142 N/N)	CC=89 (1)			CC=92 (0,979)	CG=2 (0,021)	
A1374C (375 E/A)	AA=70 (0,787)	AC=17 (0,191)	CC=2 (0,023)	AA=55 (0,630)	AC=30 (0,341)	CC=3 (0,034)
G1417T (389 L/L)	GG=78 (0,876)	GT=10 (0,112)	TT=1 (0,011)	GG=63 (0,670)	GT=29 (0,309)	TT=2 (0,022)
T1466C (406 C/R)	TT=70 (0,787)	TC=17 (0,191)	CC=2 (0,023)	TT=60 (0,638)	TC=32 (0,340)	CC=2 (0,022)
T1682C (478 S/P)	TT=70 (0,787)	TC=17 (0,191)	CC=2 (0,023)	TT=61 (0,649)	TC=31 (0,330)	CC=2 (0,022)
A1902G (551 Q/R)	AA=50 (0,562)	AG=35 (0,393)	GG=3 (0,034)	AA=50 (0,532)	AG=36 (0,383)	GG=8 (0,085)
T2531C (761 S/P)	TT=89 (1)			TT=94 (1)		

N° SNP	LOCUS	SNP	Variante	N° acceso Genbank
1	IL4R	A398G	I50V	X52425
2	IL4R	C676T	N142N	X52425
3	IL4R	A1374C	E375A	X52425
4	IL4R	G1417T	L389L	X52425
5	IL4R	T1466C	C406R	X52425
6	IL4R	T1682C	S478P	X52425
7	IL4R	A1902G	Q551R	X52425
8	IL4R	T2531C	S761P	X52425
Tabla 6: SNP detectados				

Nº SNP	Tamaño amplificón, pb	Nombre ce- bador izq. amplificón	Secuencia cebador izq.	ID. de SEC. nº:	Nombre ce- bador der. amplificón	Secuencia cebador der.	ID. de SEC. nº:
1	114	RR192B	CAGCCCCGTGTCTGCAGA	25	RR193B	GTCCAGTGTATAGTTATCCG- CACTGA	31
2	163	DBM0177B	CTGACCTGGAGCAACCCGTA	26	DBM0178B	ACTGGCCCTCTGCTGGTCA	32
3, 4, 5	228	DBM0023B	ATTGTGTGAGGAGGAGGAG- GAGGTA	27	DBM0022B	GTTGGGCATGTGAGCACTCGTA	33
6	129	DBM0097B	CTCGTCATCGCAGGCAA	28	DBM0098B	AGGGCATCTCGGGTTCTA	34
7	198	RR200B	GCCGAAATGTCCTCCAGCA	29	RR178B	CCACATTTCTCTGGGGACACA	35
8	177	DBM0112B	CCGGCCCTCCCTGGCA	30	DBM0071B	GCAGACTCAGCAACAAGAGG	36

Tabla 7: Cebadores del amplificón y longitudes

Nº SNP	nombre sonda ale- lo WT	secuencia sonda alelo WT	ID de SEC. nº:	título sonda alelo WT (µM)	nombre sonda alelo var.	secuencia sonda alelo variante	ID de SEC. nº:	título sonda alelo var. (µM)
1	DEM0081P	CCACACGTGTATCCCTGAGAA	37	1,0	DEM0082P	TCTCAGGGACACACGTGTG	46	4,0
2	DEM0172P	TGGAGTGAAAACGACCCGGCAG	38	1,0	DEM0073P	CTGCCGGTCAATTTTCGCTCC	47	1,0
3	DEM0043RC	GAGGGAAGGAGGGCATTGTG	39	1,0	DEM0139P	AGGGAAGGGCGGGCATTGT	48	4,0
4	DEM0124P	CTCTCCGAGCAGGTCCAGG	40	1,0	DEM0046RC	TCCTGGACCTTCTCGGAGAGG	49	1,0
5	DEM0076P + DEM0132P	AAGGTGAAGAAGGCATGACTCC AAGGTGGAGAAGACATGACTCC	41 42	1,0 1,0	DEM0171P	GGAGTCACGTCTTCTCTCC- TACCTT	50	2,0
6	DEM0157P	TGGCTCAGAGAGTTGCTGAAGC	43	2,0	DEM0094P	TTCAGCAACCCCTGAGCC	51	2,0
7	KW86	AGTGGCTATCAGGAGTTGT	44	1,6	KW85	AGTGGCTATCGGAGTTGT	52	0,8
8	DEM0080P	CTCTTCTCTGAGATGCCCCGAG	45	0,5	DEM0048RC	CTCGGGCATCCCAGAGAAGAG	53	0,5

Tabla 8: Sondas de hibridación y títulos

N° SNP	Frecuencia de alelo WT
1	0,53
2	0,90
3	0,89
4	0,89
5	0,89
6	0,83
7	0,79
8	0,99
Tabla 9: Frecuencia alélica del alelo WT en los fundadores del HBDI	

SNP	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0,000	0,067	0,068	0,069	0,000	0,000	0,003
2	1,00 (0,35)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,23 (0,09)	-1,00 (-0,12)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,779
4	0,23 (0,09)	-1,00 (-0,12)	1,00 (1,00)		0,000	0,000	0,000	0,782
5	0,22 (0,08)	-1,00 (-0,11)	1,00 (0,97)	1,00 (0,97)		0,000	0,000	0,807
6	0,50 (0,24)	0,39 (0,29)	0,97 (0,78)	0,97 (0,78)	1,00 (0,78)		0,000	0,000
7	0,30 (0,16)	0,36 (0,23)	0,99 (0,70)	0,99 (0,70)	1,00 (0,68)	0,99 (0,87)		0,000
8	1,00 (0,11)	0,90 (0,29)	-0,58 (-0,02)	-0,58 (-0,02)	-0,49 (-0,02)	1,00 (0,23)		
Sobre la diagonal: valor p exacto mediante la prueba de permutación								
Bajo la diagonal: D'(y Δ)								
Tabla 10: Medida del desequilibrio de ligamiento a pares								

ES 2 279 916 T3

Nº SNP	Transmisio- nes del ale- lo WT al afectado (T)	No trans- misiones del alelo WT al afectado (NT)	Transmisiones totales ob- servadas (T+NT)	Estadístico chi-cuadrado de McNemar	Significa- ción
1	144	138	282	0,128	N.S.
2	55	39	94	2,723	N.S.
3	82	46	108	2,370	N.S.
4	62	46	108	2,370	N.S.
5	61	46	107	2,103	N.S.
6	90	67	157	3,369	N.S.
7	103	81	184	2,630	N.S.
8	5	7	12	0,333	N.S.
Tabla 11A: Resultados del análisis de PTD de un único locus, sólo en los 282 casos índice					

N° SNP	Transmisiones del alelo WT al afectado (T)	No transmisiones del alelo WT al afectado (NT)	Transmisiones totales observadas (T+NT)	Estadístico chi-cuadrado de McNe-mar	Significación	% Transmisión T/ (T+NT)
1	311	280	591	1,626	N.S.	
2	107	90	197	1,467	N.S.	
3	130	98	228	4,491	P<0,05	57,0%
4	130	98	228	4,491	P<0,05	57,0%
5	128	98	226	3,982	P<0,05	56,6%
6	189	1,49	338	4,734	P<0,05	55,9%
7	212	180	392	2,612	N.S.	
8	12	13	25	0,040	N.S.	

Tabla 11B: Resultados del análisis de PTD en un único locus, en 564 afectados primarios y 26 hijos adicionales

SNP detec- tado de forma espe- cífi- ca de alelo	Tamaño de amplificón, pb	Otros SNP cubiertos en el amplificón	Nombre común del cebador	Secuencia común	Secuencia del cebador de Sec. Nº	Nombre del cebador específico alelo WT	Secuencia del cebador específico alelo WT	Id. de Sec. Nº	Nombre del cebador específico alelo variante	Secuencia del cebador específico alelo variante	Id. de Sec. Nº
6	678	4, 5, 6, 7	RR178B	CCACATTCTCTGGGACACA	54	DBM0149B	TTCGAGGAGGAGGGA	57	TTCGAGGAGGGAAGGGC	DBM0150B	60
7	639	3, 4, 5, 6	DBM0023B	ATTGTGTGAGGAGGAGGAGGTA	55	DBN9155B	CACCGCATGTACAACTCCT	58	CACCGCATGTACAACTCCG	DBM0156B	61
8	413	3, 4, 5	DBM0023B	ATTGTGTGAGGAGGAGGAGGTA	56	DBM0194B	GGTACTGGCTCAGGGA	59	GGTACTGGCTCAGGGG	DBM0195B	62

Tabla 12: Cebadores de PCR específicos de alelo y longitud del amplificón

Grupo(n)	IPD=2	IPD=1	IPD=0	valor P
Todas las familias (256)	30,7%	47,9%	21,5%	N.S.
Uno/ambos hermanos DR3/4 (119)	26,1%	50,4%	23,5%	N.S.
Ningún hermano DR3/4 (137)	34,7%	45,6%	19,7%	0,03
Expectativa	25%	50%	25%	

Tabla 13: Distribuciones IPD para los haplotipos IL4R

Haplotipo de 8 locus de IL4R	Contajes			Frecuencia observada		Estadístico Chi-cuadrado	valor P
	Transmitido	CDFA	Total	Transmitido	CDFA		
1 1 1 1 1 1 1 1	259,5	109,5	369	46,3%	41,8%	0,82	0,36
2 1 1 1 1 1 1 1	170,5	71,5	242	30,4%	27,3%	0,60	0,44
2 1 2 2 2 2 1 1	29,5	23,5	53	5,3%	9,0%	3,79	0,05
2 2 1 1 1 1 1 1	23,5	13	36,5	4,2%	5,0%	0,24	0,63
1 1 2 2 2 2 1 1	23	12,5	35,5	4,1%	4,8%	0,18	0,67
2 2 1 1 1 2 2 1	20,5	14	34,5	3,7%	5,3%	1,20	0,27
1 1 1 1 1 1 2 1	19	9	28	3,4%	3,4%	0,00	0,98
2 1 1 1 1 1 2 1	3,5	3	6,5	0,6%	1,1%	0,61	0,43
2 2 1 1 1 2 2 2	4,5	2	6,5	0,8%	0,8%	0,00	0,95
otros	6,5	4	10,5	1,2%	1,5%	0,19	0,67
TOTAL	560	262	822			7,64	0,94

Tabla 14A: Transmisiones de haplotipo mediante el método CDFA: todas las familias

Haplotipo de 8 locus de IL4R	Contajes			Frecuencia observada		Estadístico Chi cuadrado	valor P
	Transmitido	CDFA	Total	Transmitido	CDFA		
1 1 1 1 1 1 1 1	254	50,5	304,5	46,7%	41,6%	0,57	0,45
2 1 1 1 1 1 1 1	156	30	186	28,7%	24,7%	0,56	0,45
2 1 2 2 2 2 1 1	35	11	46	6,4%	9,1%	0,99	0,32
2 2 1 1 1 1 1 1	24	7	31	4,4%	5,8%	0,39	0,53
1 1 1 1 1 1 2 1	20	6	26	3,7%	4,9%	0,40	0,52
1 1 2 2 2 2 1 1	18	7	25	3,3%	5,8%	1,59	0,21
2 2 1 1 1 2 2 1	18	4	22	3,3%	3,3%	0,00	0,99
2 2 1 1 1 2 2 2	8	2	10	1,5%	1,6%	0,02	0,89
2 2 1 1 1 2 2 2	8	1	9	1,5%	0,8%	0,31	0,58
2 1 1 1 1 1 2 1	1	2	3	0,2%	1,6%	4,71	0,03
2 1 1 1 1 2 2 1	2	1	3	0,4%	0,8%	0,46	0,50
TOTAL	544	121,5	665,5			10,00	0,44

Tabla 14B: Transmisiones de haplotipo mediante el método CDFA: subgrupo de familias "uno/ambos her-
manos DR3/4"

Haplotipo de 8 locus de IL4R	Contajes			Frecuencia observada		Estadístico Chi-cuadrado	valor P
	Transmitido	CDFA	Total	Transmitido	CDFA		
1 1 1 1 1 1 1 1	267	62,5	329,5	45,7%	40,7%	0,68	0,409
2 1 1 1 1 1 1 1	185	43	228	31,7%	28,0%	0,53	0,467
2 1 2 2 2 2 1 1	24	15,5	39,5	4,1%	10,1%	8,14	0,004
1 1 2 2 2 2 1 1	30	6	36	5,1%	3,9%	0,38	0,540
2 2 1 1 1 2 2 1	23	10	33	3,9%	6,5%	1,80	0,179
2 2 1 1 1 1 1 1	23	7,5	30,5	3,9%	4,9%	0,26	0,607
1 1 1 1 1 1 2 1	17	5	22	2,9%	3,3%	0,05	0,825
2 1 1 1 1 1 2 1	8	1	9	1,4%	0,7%	0,51	0,473
2 2 1 1 1 2 2 2	3	1	4	0,5%	0,7%	0,04	0,837
1 1 1 1 1 2 2 1	2	1	3	0,3%	0,7%	0,29	0,593
2 1 2 2 1 1 2 1	2	1	3	0,3%	0,7%	0,29	0,593
TOTAL	584	153,5	737,5			12,97	0,226

Tabla 14C: Transmisiones de haplotipo mediante el método CDFA: subgrupo de familias "ningún hermano

DR3/4

N° SNP	Transmitido (n=540)			CDFA (n=121,5)			Estadístico Chi-cuadrado	Valor p (gl=1)
	contaje de alelos		frecuencia alelo variante	contaje de alelos		frecuencia alelo variante		
	wt	variante		wt	variante			
1	296	244	45,2%	64,5	57	46,9%	0,12	0,730
2	490	50	9,3%	107,5	14	11,5%	0,58	0,446
3	485	55	10,2%	103,5	18	14,8%	2,17	0,141
4	485	55	10,2%	103,5	18	14,8%	2,17	0,141
5	485	55	10,2%	103,5	18	14,8%	2,17	0,141
6	457	83	15,4%	96,5	25	20,6%	1,97	0,161
7	436	104	19,35	88,5	33	27,2%	3,77	0,052
8	532	8	1,5%	119,5	2	1,6%	0,02	0,893
TOTAL								

Tabla 15A. Transmisiones de alelo SNP a SNP mediante el método CDFA: subgrupo de familias "uno/ambos hermanos DR3/4"

N° SNP	Transmitido (n=588)			CDFA (n=158,5)			Estadístico Chi-cuadrado	Valor p (gl=1)
	contaje de alelos		frecuencia alelo variante	contaje de alelos		frecuencia alelo variante		
	wt	variante		wt	variante			
1	320	268	45,6%	77,5	81	51,1%	1,53	0,216
2	539	49	8,3%	139	19,5	12,3%	2,36	0,124
3	529	59	10,0%	132	26,5	16,7%	5,50	0,019
4	529	59	10,0%	132	26,5	16,7%	5,50	0,019
5	534	54	9,2%	136	22,5	14,2%	3,41	0,065
6	502	86	14,6%	121	37,5	23,7%	7,38	0,007
7	475	113	19,2%	115	43,5	27,4%	5,10	0,024
8	584	4	0,7%	157,5		0,6%	0,00	0,946

Tabla 15B. Transmisiones de alelo SNP a SNP mediante el método CDFA: subgrupo de familias "ningún hermano DR3/4"

ES 2 279 916 T3

Haplotipo	Transmi- tido a afectado	No trans- mitido a afectado	TOTAL TRANS- MISIONES OBSERVADAS	Estadístico Chi-cuadrado de McNemar	Valor p (gl=1)	% TRANS- MISIÓN
11111111	140	131	271	0,299	0,585	51,7%
21111111	130	105	235	2,660	0,103	55,3%
21222221	27	39	66	2,182	0,140	40,9%
22111111	19	28	47	1,723	0,189	40,4%
11222221	19	24	43	0,581	0,446	44,2%
22111221	17	23	40	0,900	0,343	42,5%
11111121	18	15	33	0,273	0,602	54,5%
22111222	6	5	11	0,091	0,763	54,5%
21111121	1	5	6	2,667	0,102	16,7%
11111221	1	3	4	1,000	0,317	25,0%
11221221	2	0	2	2,000	0,157	100,0%
21221121	1	1	2	0,000	1,000	50,0%
21221221	0	2	2	2,000	0,157	0,0%
11221111	0	1	1	1,000	0,317	0,0%
11111222	1	0	1	1,000	0,317	100,0%
total	382	382	764			
Tabla 16A: Análisis PTD de haplotipos de 8 locus sólo a casos índice.						

Haplotipo	Transmi- tido a afectado	No trans- mitido a afectado	TOTAL TRANS- MISIONES OBSERVADAS	Estadístico Chi-cuadrado de McNemar	Valor p (gl=1)	% TRANS- MISIÓN
21222221	52	80	132	5,939	0,015	39,4%
21111111	245	225	470	0,851	0,356	52,1%
11111111	283	259	542	1,063	0,303	52,2%

ES 2 279 916 T3

22111111	43	51	94	0,681	0,409	45,7%
11221221	3	1	4	1,000	0,317	75,0%
11222221	44	42	86	0,047	0,829	51,2%
22111221	37	43	80	0,450	0,502	46,3%
11111121	36	30	66	0,545	0,460	54,5%
22111222	1	11	22	0,000	1,000	50,0%
21111121	3	9	12	3,000	0,083	25,0%
21221121	2	2	4	0,000	1,000	50,0%
21221221	0	4	4	4,000	0,046	0,0%
11111221	4	4	8	0,000	1,000	50,0%
11221111	0	2	2	2,000	0,157	0,0%
11111222	1	1	2	0,000	1,000	50,0%

Tabla 16B: Análisis PTD de haplotipos de 8 locus en los dos hijos primarios afectados por familia.

Haplotipo	Transmi- tido a afectado	No trans- mitido a afectado	TOTAL TRANS- MISIONES OBSERVADAS	Estadístico Chi-cuadrado de McNemar	Valor p (gl=1)	% TRANS- MISIÓN
11111111	295	272	567	0,933	0,334	52,0%
21111111	259	236	495	1,069	0,301	52,3%
21222221	55	88	143	7,615	0,006	38,5%
22111111	45	53	98	0,653	0,419	45,9%
11222221	44	43	87	0,011	0,915	50,6%
22111221	40	46	86	0,419	0,518	46,5%
11111121	38	30	68	0,941	0,332	55,9%
22111222	12	11	23	0,043	0,835	52,2%
21111121	3	10	13	3,769	0,052	23,1%
11111221	6	4	10	0,400	0,527	60,0%

ES 2 279 916 T3

21221221	1	5	6	2,667	0,102	16,7%
11221221	3	2	5	0,200	0,655	60,0%
21221121	3	2	5	0,200	0,655	60,0%
11221111	0	2	2	2,000	0,157	0,0%
11111222	1	1	2	0,000	1,000	50,0%
TOTAL	805	805	1610			
Tabla 16C: Análisis PTD de haplotipos de 8 locus en todos los hijos afectados.						

Haplotipo	Transmi- tido a afectado	No trans- mitido a afectado	TOTAL TRANS- MISIONES OBSERVADAS	Estadístico Chi-cuadrado de McNemar	Valor p (gl=1)	% TRANS- MISIÓN
11111111	133	121	254	0,567	0,451	52,45
21111111	105	101	206	0,078	0,780	51,0%
21222221	30	36	66	0,545	0,460	45,5%
22111111	22	26	48	0,333	0,564	45,8%
11222221	19	19	38	0,000	1,000	50,0%
22111221	16	22	38	0,947	0,330	42,1%
22111222	14	14	28	0,000	1,000	50,0%
22111222	8	6	14	0,286	0,593	57,1%
21111121	1	5	6	2,667	0,102	16,7%
11111221	2	0	2	2,000	0,157	100,0%
TOTAL	350	350	700			
Tabla 17A: Análisis de haplotipos de 8 locus en los dos hijos primarios afectados por familia: subgrupo "uno/ambos hermanos DR3/4"						

ES 2 279 916 T3

Haplotipo	Transmi- tido a afectado	No trans- mitido a afectado	TOTAL TRANS- MISIONES OBSERVADAS	Estadística McNemar Chi- cuadrado	Valor p (gl=1)	% TRANS- MISIÓN
11111111	138	126	264	0,545	0,460	52,3%
21111111	128	112	240	1,067	0,302	53,3%
21222221	22	44	66	7,333	0,007	33,3%
22111111	23	29	52	0,692	0,405	44,2%
11222221	28	20	48	1,333	0,248	58,3%
22111111	21	25	46	0,348	0,555	45,7%
11111121	17	11	28	1,286	0,257	60,7%
22111222	3	5	8	0,500	0,480	37,5%
11111221	2	4	6	0,667	0,414	33,3%
21111121	2	4	6	0,667	0,414	33,3%
11221221	3	1	4	1,000	0,317	75,0%
21221121	2	2	4	0,000	1,000	50,0%
21221221	0	4	4	4,000	0,046	0,0%
11221111	0	2	2	2,000	0,157	0,0%
11111222	1	1	2	0,000	1,000	50,0%
TOTAL	390	390	780			
Tabla 17B: Análisis PTD de haplotipos de 8 locus en los dos hijos afectados primarios por familia: subgrupo "ningún hermano DR3/4"						

N° SNP	Frecuencia de alelos WT en controles	Frecuencia de alelos WT en diabéticos	valor P me- diante test-z
1	0,559	0,461	0,077
2	0,989	1,000	0,480
3	0,793	0,882	0,031
4	0,824	0,933	0,003
5	0,809	0,882	0,075
6	0,814	0,882	0,097
7	0,723	0,770	0,362
8	1,000	1,000	1,000
n=	188	178	cromosomas

Tabla 18: Frecuencias alélicas comparadas entre filipinos control y diabéticos

	Frecuencia EMV: con- troles	Frecuencia EMV: dia- béticos	CP	Contaje: control	Contaje: diabéticos	Contaje total	exp control	exp diabé- ticos	chi- cuadrado	Valor P
1L4R										
11111111	0,318	0,329	1,1	59,7	58,5	118,2	60,7	57,5	0,033	0,855
11111121	0,074	0,074	1,0	14,0	13,2	27,2	14,0	13,2	0,000	0,987
11222221	0,145	0,058	0,4	27,3	10,3	37,6	19,3	18,3	6,727	0,009
21111111	0,390	0,441	1,2	73,3	78,5	151,8	78,0	73,8	0,582	0,445
21212221	0,032	0,051	1,6	6,0	9,0	15,0	7,7	7,3	0,776	0,378
n=	188	178				366				

Tabla 19: Frecuencias de los haplotipos estimadas informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos.

Haplotipo	Frecuencia calc.: controles	Frecuencia calc.: diabéticos	CP	Contaje: control	Contaje: diabéticos	Contaje total	exp control	exp diabé- ticos	chi- cuadrado	Valor P
IL4R										
x1111111	0,707	0,770	1,4	133,0	137,0	270,0	138,7	131,3	0,480	0,489
x1111121	0,074	0,112	1,6	14,0	20,0	34,0	17,5	16,5	1,413	0,235
x1222221	0,154	0,067	0,4	29,0	12,0	41,0	21,1	19,9	6,155	0,013
x1212221	0,032	0,051	1,6	6,0	9,0	15,0	7,7	7,3	0,776	0,378
x1222111	0,005	0,000	0,0	1,0	0,0	1,0	0,5	0,5	0,947	0,331
x2111111	0,011	0,000	0,0	2,0	0,0	2,0	1,0	1,0	1,894	0,169
x1221121	0,016	0,000	0,0	3,0	0,0	3,0	1,5	1,5	2,840	0,092
			n=	188,0	178,0	366		overall	14,504	0,024

Tabla 20: Haplotipos observados y frecuencias comparadas entre filipinos control y diabéticos..

TABLA 21

Frecuencias alélicas en pacientes y controles

Gen	Descripción alelo	alelo	Frec.	Frec. pa- mayorit. minorit.	Valor cientes	Cp ^b	IC 95%
SNP					P		
T1D							
IL4R	5' (-3223) ^c	C	T	41,9%	51,1%	0,10	1,45 0,96, 2,19
	5' (-1914) ^c	C	T	44,1%	42,7%	0,86	1,06 0,70, 1,60
	I50V ^d	A	G	44,1%	53,9%	0,06	1,48 0,98, 2,23
	N142N ^d	C	G	1,1%	0,0%	0,17	0,00
	E375A ^d	A	C	20,7%	11,7%	0,02	0,50 0,28, 0,90
	L389L ^d	G	T	17,6%	6,7%	0,001	0,34 0,17, 0,67
	C406R ^d	T	C	19,1%	11,7%	0,05	0,56 0,31, 0,99
	S478P ^d	T	C	18,6%	11,7%	0,06	0,58 0,32, 1,04
	Q551R ^d	A	G	27,7%	23,3%	0,34	0,80 0,50, 1,27
	S761P ^d	T		100,0%	100,0%	n.a.	n.a.
IL4	5' (-524) ^e	C	T	30,9%	34,4%	0,46	1,18 0,76, 1,82
IL13	5' (-1512) ^f	A	C	30,6%	41,0%	0,05	1,58 1,03, 2,42

5' (-1112) ^f	C	T	23,1%	30,9%	0,117	1,49	0,94, 2,37
Intron 3 ^f	C	T	40,4%	45,6%	0,32	1,23	0,82, 1,86
R110Q ^f	G	A	39,9%	46,1%	0,23	1,29	0,85, 1,95

^a Diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles cuando se analizan utilizando una prueba de chi-cuadrado.

^b Los cocientes de probabilidad se refieren al alelo minoritario.

^c Secuencia n° acceso AC004525.1

^d Secuencia n° acceso X52425.1

^e Secuencia n° acceso M23442.1

^f Secuencia n° acceso U10307.1

TABLA 22**Desequilibrio de ligamiento a pares entre los SNP de IL4R**

	-3223(T)	-1914(T)	50(G)	142(G)	375(C)	389(T)	406(C)	478(C)	551(G)
-3223(T)	-	-0,183***	0,176***	0,004	-0,063***	-0,068***	-0,061***	-0,059***	-0,068***
-1914(T)	-1,0	-	0,068***	-0,005	0,105	0,029*	0,014	0,011	0,027
50(G)	0,75	-0,81	-	0,006	-0,049**	-0,067***	-0,043**	-0,039**	-0,079***
142(G)	1,0	-1,0	1,0	-	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,003
375(C)	-0,70	0,70	-0,53	-1,0	-	0,139***	0,152***	0,147***	0,145***
389(T)	-0,93	0,29	-0,86	-1,0	1,0	-	0,126***	0,122***	0,122***
406(C)	0,74	0,13	-0,49	-1,0	1,0	0,89	-	0,150***	0,133***
478(C)	0,74	0,62	-0,48	-1,0	1,0	0,85	1,0	-	0,135***
551(G)	-0,56	0,17	-0,65	-1,0	0,96	0,96	0,96	1,0	-

Por encima de la diagonal ($D = P_{ab} - P_a \cdot P_b$). Por debajo de la diagonal D' (desequilibrio de ligamiento normalizado, $D' = D/D_{\max}$). Todos los valores se refieren al alelo minoritario indicado en la tabla. Los valores de desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativos se indican como sigue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

TABLA 23

Desequilibrio de ligamiento a pares entre los SNP de IL4 e IL13

	IL4-524 (C)	IL13-1512 (C)	IL13-1112 (T)	IL13 intr (T)	IL13 110 (A)
IL4 -524 (C)	-	0,062***	0,069***	0,024	0,063 ***
IL13 -1512 (C)	0,29	-	0,163***	0,057***	0,058**
IL13 -1112 (T)	0,41	1,0	-	0,077***	0,078***
IL13 intr (T)	0,13	0,31	0,54	-	0,201 ***
IL13 110 (A)	0,34	0,31	0,55	0,84	-

Por encima de la diagonal ($D = P_{ab} - P_a \cdot P_b$). Por debajo de la diagonal D' (desequilibrio de ligamiento normalizado, $D' = D/D_{max}$).

Los valores de desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativos se indican como sigue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

ES 2 279 916 T3

TABLA 24

Frecuencias de los genotipos en diabéticos y controles

		Geno-	Controles	T1DM	prueba	CP	IC 95%
		tipo			exacta de		
					Fisher		
5							
10							
15	IL4R	CC	29,0%	24,1%		0,78	(0,40, 1,51)
	3223	CT	58,1%	51,7%	0,1584	0,77	(0,43, 1,38)
		TT	12,9%	24,1%		2,15	(0,99, 4,68)
20	IL4R1	CC	31,2%	36,0%		1,24	(0,67, 229)
	914	TC	49,5%	42,7%	0,6636	0,76	(0,43, 1,36)
25		TT	19,4%	21,3%		1,13	(0,55, 2,33)
	IL4R	AA	34,7%	23,6%		0,58	(0,30, 1,11)
30	50	AG	43,2%	44,9%	0,1846	1,08	(0,60, 1,93)
		GG	22,1%	31,5%		1,62	(0,84, 3,13)
35	IL4R	CC	97,9%	100,0%			
	142	CG	2,1%	0,0%	0,4978		
	IL4R	AA	62,1%	78,7%		2,25	(1,17, 4,33)
40	375	AC	34,7%	19,1%	0,038	0,44	(0,23, 0,87)
		CC	3,2%	2,2%		0,70	(0,12, 4,32)
45	IL4R	GG	67,4%	87,6%		3,43	(1,60, 7,37)
	389	GT	30,5%	11,2%	0,002	0,29	(0,13, 0,63)
50		TT	2,1%	1,1%		0,53	(0,05, 5,93)
	IL4R	CC	2,1%	2,2%		1,07	(0,15, 7,76)
55	406	TC	33,7%	19,1%	0,0585	0,46	(0,24, 0,92)
		TT	64,2%	78,7%		2,05	(1,06, 3,97)
	IL4R	CC	2,1%	2,2%		1,07	(0,15, 7,76)
60	478	TC	32,6%	19,1%	0,0904	0,49	(0,25, 0,96)
		TT	65,3%	78,7%		1,96	(1,01, 3,79)

ES 2 279 916 T3

5	IL4R	AA	52,6%	57,3%		1,21	(0,68, 2,16)
	551	AG	38,9%	38,2%	0,5613	0,97	(0,53, 1,76)
		GG	8,4%	4,5%		0,51	(0,15, 1,76)
10	IL4	- CC	10,5%	12,4%		1,20	(0,48, 2,98)
	590	CT	40,0%	42,7%	0,8143	1,12	(0,62, 2,01)
15		TT	49,5%	44,9%		0,83	(0,47, 1,49)
	IL13	CC	33,7%	31,5%		0,90	(0,49, 1,68)
20	INT3	CT	50,5%	46,1%	0,5413	0,84	(0,47, 1,49)
	C	TT	15,8%	22,5%		1,55	(0,74, 3,25)
25	IL13	AA	12,6%	27,0%		2,55	(1,19, 5,49)
	110	GA	54,7%	38,2%	0,0252	0,51	(0,28, 0,92)
		GG	32,6%	34,8%		1,10	(0,60, 2,03)
30	IL13	AA	48,4%	34,8%		0,57	(0,31, 1,03)
	1512	AC	41,9%	48,3%	0,1363	1,29	(0,72, 2,32)
35		CC	9,7%	16,9%		1,89	(0,78, 4,57)
	IL13	CC	60,2%	51,7%		0,71	(0,39, 1,27)
40	1112	CT	33,3%	34,8%	0,2429	1,07	(0,58, 1,97)
		TT	6,5%	13,5%		2,26	(0,81, 6,31)

45

50

55

60

65

ES 2 279 916 T3

TABLA 25A

Haplotipos moleculares de IL-4 R en filipinos diabéticos y controles

Haplotipo de 7 SNP	Frec. en controles	Frec. en diabéticos	valor P chi- cuadrado	CP	IC 95%
CAGTTAT	70,7%	77,0%	0,49	1,38	(0,9, 2,2)
CCTCCGT	15,4%	6,7%	0,013	0,40	(0,2, 0,8)
GAGTTAT	1,1%	0,0%	0,50	0,0	(0,0, 5,8)
CAGTTGT	7,4%	11,2%	0,23	1,57	(0,8,3,2)
CCGCCGT	3,2%	5,1%	0,38	1,62	(0,6,4,6)
CCTTTGT	1,6%	0,0%	0,27	0,0	(0,0,3,5)
CCTGTAT	0,5%	0,0%	0,98	0,0	(0,0,15,8)
total (6 g.l.)			0,076		
n=	188	178			

TABLA 25B

Frecuencias estimadas de los haplotipo de 10 SNP de IL4R en diabéticos y controles

ID-H	de Haplotipo	10 Controles	DE	T1DM	DE	CP	IC 95%	Valor P ^b
8 locus	locus de IL4R	^a N=188		N=180				
H-5A	CCACCTCCGT	5,8%	(1,7%)	0,0%		0,00	(0,0, 0,8)	0,001
H-5B	CTACCTCCGT	8,5%	(2,3%)	5,8%	(2,2%)	0,66	(0,3, 1,6)	0,33
H-3A	CTGCCTCCGT	0,9%	(0,6%)	0,0%		0,00	(0,0, 6,0)	0,21
H-3B	TCGCCTCCGT	0,0%		0,9%	(1,1%)	n.a.		0,19
Total (23 g.l.)								
0,04								

58

^a las frecuencias de los haplotipos de máxima verosimilitud se computaron utilizando un algoritmo de maximización de expectativa (ME) (véase Excoffier y Slatkin 1995) como el desarrollado por el programa de software Arlequin (L. Excoffier, Universidad de Génova, CH). La desviación estándar se computó realizando 100 réplicas bootstrap. Se observaron 24 de los 512 posibles haplotipos. Los cuatro que se muestran aquí incluyen el haplotipo de 7 SNP asociado con la enfermedad. Los dos haplotipos de 8 SNP que contienen el haplotipo de 7 SNP se denominaron H-3 y H-5 en referencia a Mirel et al., (en prensa). La desviación estándar se computó realizando 100 réplicas bootstrap.

^b Las diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles se analizaron utilizando una prueba de chi-cuadrado.

TABLA 26**Frecuencias estimadas de los haplotipos de 5 SNP de IL4 e IL13 en diabéticos y controles**

Haplotipo de 5	Controles	DE	T1DM N=176*	DE	CP	Valor P
locus	N=188					
CACCA	4,1%	(1,3%)	3,5%	(1,7%)	0,84	
CACCG	8,9%	(2,2%)	10,6%	(2,9%)	1,21	
CACTA	1,3%	(1,1%)	3,0%	(1,8%)	2,26	
CATTA	0,0%		0,6%	(0,5%)	n.a.	
CCCCG	1,5%	(1,0%)	0,9%	(0,9%)	0,61	
CCTCG	1,1%	(0,9%)	5,5%	(2,3%)	5,19	0,02
CCTTA	12,6%	(2,4%)	9,3%	(2,0%)	0,71	
CCTTG	0,0%		0,4%	(0,7%)	n.a.	
TACCG	33,6%	(3,8%)	21,9%	(3,9%)	0,55	0,03
TACTA	16,4%	(3,3%)	16,3%	(3,0%)	0,99	
TACTG	5,0%	(1,7%)	3,2%	(1,4%)	0,62	
TCCCG	4,6%	(1,8%)	9,8%	(2,9%)	2,23	0,06
TCCTA	1,3%	(1,1%)	0,0%		0,00	
TCCTG	0,2%	(0,5%)	0,0%		0,00	

TCTCG	5,3%	(2,4%)	1,7%	(1,2%)	0,31	0,07
TCTTA	4,1%	(2,1%)	12,8%	(2,2%)	3,47	0,004
TCTCA	0,0%		0,6%	(0,7%)	n.a.	
Total (16 g.l.)						0,005

* debido a genotipos no disponibles

(orden de los SNP: IL4-524, IL13-1512, IL13-1112, IL13INT3, IL13R110)

TABLA 27

Prueba de la independencia entre las frecuencias de los genotipos en los SNP de IL4R y las frecuencias de los genotipos en los cinco SNP de IL4 e IL13.

SNP cromosoma 5	Controles	T1D
IL4 -524	0,15	0,001
IL13 -1512	0,77	0,78
IL13 -1112	0,93	0,73
IL13 110	0,99	0,91
IL3 intron 3	0,99	0,019

TABLA 28

Epistasis entre IL4R y cinco SNP de IL4 e IL13

	$\beta 3$	EE	CP	Chi-cuadrado de Walds	Valor P nominal
IL4 -524:i14r	-0,22	0,10	0,81	4,55	0,033
IL13-1512:i14r	0,04	0,15	1,04	0,06	0,811
IL13-1112:i14r	0,10	0,16	1,10	0,37	0,545
IL13 110:i14r	0,14	0,09	1,15	2,24	0,135
IL13INT3:i14r	0,17	0,09	1,18	3,19	0,074

El valor P general para las cinco pruebas de análisis de permutación fue $p < 0,045$ (véase texto).

TABLA 29

Sondas de IL4 e IL13

SNP	Alelo	Sondas	Secuencia Sonda	ID de n°:	SEC.	Conc. (μM)
IL4P C582T	C	KW66	AACATTGTCCCCCAGTGC	63		1,2
IL4P C582T	T	KW89	AGCACTGGGGAACAATGTTTC	64		0,9
IL13 Int 3	C	DBM0161P	TTCTACTCAGGTGCTGACCT	65		1,0
IL13 Int 3	T	DBM0164P	GGTCAGCACATGAGTAGAACG	66		0,3
IL13 Ex 4 R110Q		DBM0136P	TCAGTTGAACCGTCCCTCG	67		1,0

IL13 Ex 4 R110Q	DBM0181P	GAGGGACAGTTCAACTGAAAC	68	1,0
-----------------	----------	-----------------------	----	-----

TABLA 30

Cebadores del amplicón y Longitudes

Exón	Tamaño amplicón	Cebador derecho	ID. de SEC. n°:	Secuencia	Cebador izquierdo	ID. de SEC. n°:	Secuencia
IL4P	107	RR169B	69	ACTAGGCCTCACCTGATACGA	RR170B	72	CATAGAGGCAGAAATAACAGGCAGA
IL13 in 3	118	DBM0165B	70	CTCGGACATGCAAGCTGGAA	DBM0166B	73	ACTGAATGAGACAGTCCCTTGGGA
IL13 ex 4	187	DBM0167B	71	AATCGAGGTGCCCCAGTTTGTA	DBM0168B	74	CCTAACCCCTCCTTCCCGCCTA

TABLA 31

Cebadores del amplicón y Longitudes de IL4R

Exón	Tamaño amplicón	Alelo	Cebador	ID. de SEC. n°:	Secuencia
T (-1914)C	49	T	DBM0659 DBM0661	75 76	ACTGACTTATCTTTACTGTCACTTCT GCAAGACAGCCCAACCC
T (-1914)C	49	C	DBM0660	77	TGACTTATCTTTACTGTCACTTCC

				DBM0661	76	GCAAGACAGCCACCAACCC
C (-3223) T	42	C		DBM0672	79	CCTGCTCCCAGGACTGAC
				DBM0667	80	CCCAGACTTTATCTGTGACTGCTC
C (-3223) T	42	T		DBM0671	81	CCTGCTCCCAGGACTGAT
				DBM0667	80	CCCAGACTTTATCTGTGACTGCTC

TABLA 32**Cebadores del amplicón y Longitudes de IL13**

Exón	Tamaño amplicón	Alelo	Cebador	ID. de SEC. n°:	Secuencia
A (-1512) C	44	A	DBM0650	82	GGAAACAGGCCCGTAGA
			DBM0652	83	GAGTGCCGCTACTTGGCC
A (-1512) C	43	C	DBM0651	84	GAAACAGGCCCGTAGC
			DBM0652	83	GAGTGCCGCTACTTGGCC
C □ (□1112) □ T	55	C	DBM0656	85	TCTGGAGGACTTCTAGGAAAAC
			DBM0658	86	TGCAGCCATGTCGCCCTTT
C □ (□1112) □ T	55	T	DBM0657	87	TCTGGAGGACTTCTAGGAAAAT
			DBM0658	86	TGCAGCCATGTCGCCCTTT

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación del riesgo de los individuos de padecer diabetes tipo 1, que comprende la
5 detección de la presencia de al menos uno de los polimorfismos asociados a la diabetes tipo 1, A(-1512)C, C(-1112)T, C4045T y G4166A en el locus de IL13, como se lista en la Tabla 2, en una muestra de ácido nucleico del individuo, y en el que la presencia de dicho polimorfismo indica el riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de ácido nucleico comprende DNA.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de ácido nucleico comprende RNA.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de ácido nucleico se amplifica.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que la muestra de ácido nucleico se amplifica mediante una reacción en cadena de la polimerasa.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el polimorfismo se detecta mediante amplificación.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en el que el polimorfismo se detecta mediante una reacción en cadena de la polimerasa.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el polimorfismo se detecta mediante secuenciación.
- 25 9. El método de la reivindicación 1, en el que el polimorfismo se detecta al poner en contacto la muestra de ácido nucleico, bajo condiciones que permiten la unión del oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico, con al menos un oligonucleótido específico de secuencia que hibrida bajo condiciones astringentes con un polimorfismo asociado a la diabetes tipo 1, y detectar la hibridación.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, que además comprende la detección del polimorfismo de IL4 (-524) listado en la Tabla 21.
11. El método de las reivindicaciones 1 o 10, que además comprende la detección de un polimorfismo de IL4R
listado en la Tabla 2.
- 35 12. El método de la reivindicación 11, en el que el polimorfismo de IL4R es IL4R 5'(-3223).
13. El método de la reivindicación 1, que comprende la detección del polimorfismo de IL13 5'(-1112).
- 40 14. Un equipo para la determinación del riesgo de un individuo de padecer diabetes tipo 1 que comprende,
(a) uno o más oligonucleótidos específicos de secuencia y que individualmente comprenden una secuencia que
hibrida bajo condiciones astringentes con el alelo variante del polimorfismo de IL13 asociado a la diabetes tipo 1,
A(-1512)C o C(-1112)T como se lista en la Tabla 2, y
45 (b) las instrucciones de uso del equipo para la determinación del riesgo de los individuos de padecer diabetes tipo
1.
15. El equipo de la reivindicación 14, en el que los oligonucleótidos son totalmente complementarios a una secuen-
50 cia de ácido nucleico que comprende el polimorfismo de IL13 asociado a la diabetes tipo 1, A(-1512)C o C(-1112)T
como se lista en la Tabla 2.
16. El equipo de la reivindicación 14, que contiene cebadores adicionales de secuenciación.
- 55 17. El equipo de la reivindicación 14, en el que uno o más oligonucleótidos específicos de secuencia están marca-
dos.
18. El equipo de la reivindicación 17 que incluye un reactivo para la detección del marcaje.
- 60 19. La utilización de la detección de uno o más de los polimorfismos de IL13, A(-1512)C, C(-1112)T, C4045T y
G4166A, como se listan en la Tabla 21, en una muestra de ácido nucleico de un individuo para la determinación del
riesgo del individuo de padecer diabetes tipo 1.

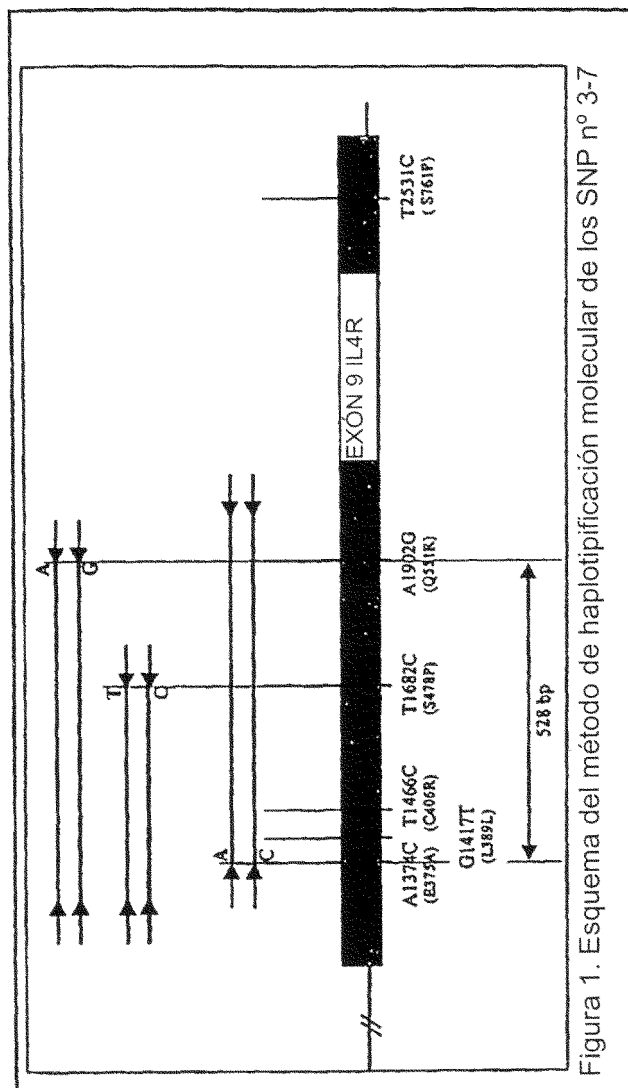


Figura 1. Esquema del método de haplotipificación molecular de los SNP nº 3-7

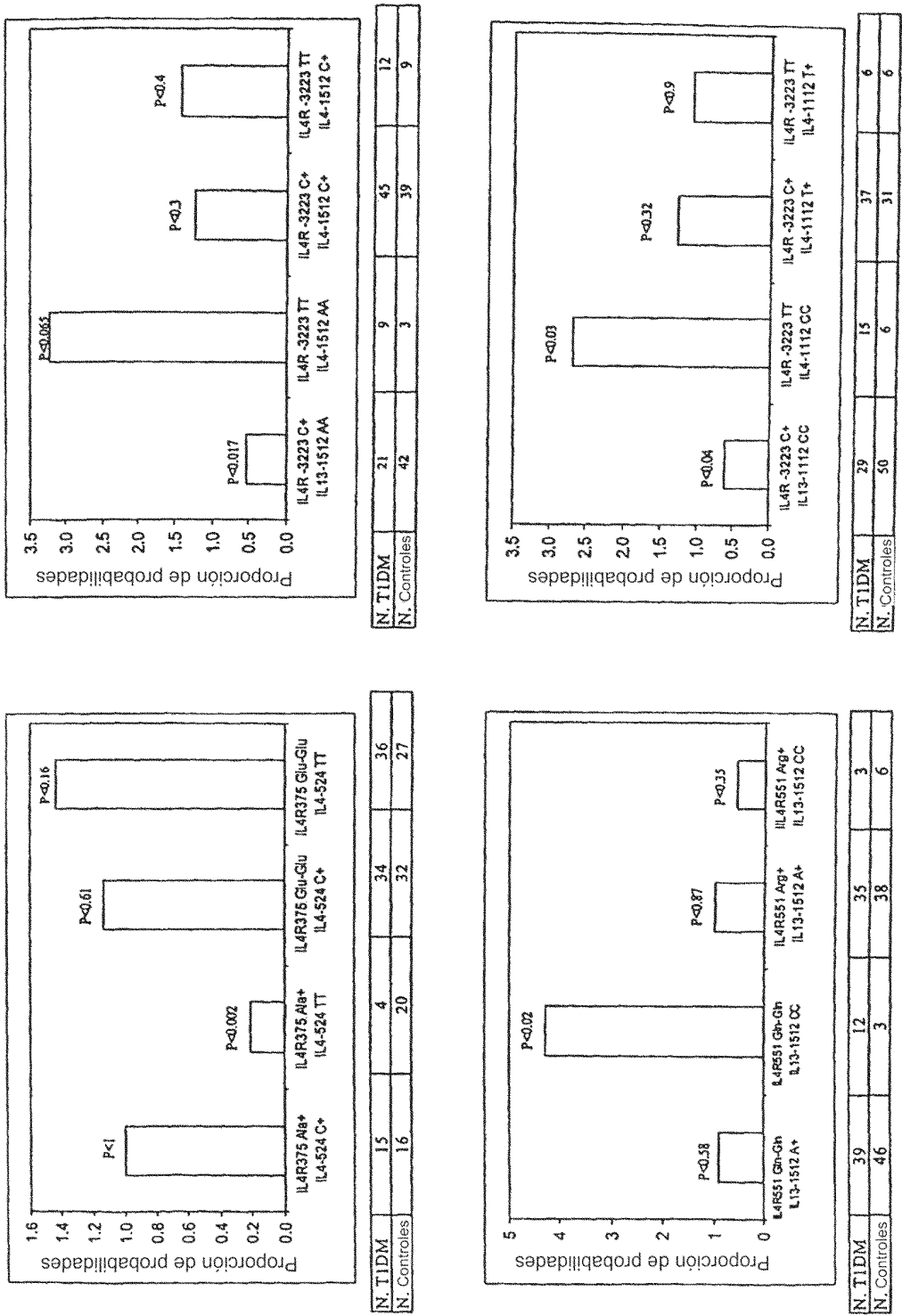


FIGURA 2

ES 2 279 916 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> DETECCIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES AUTOINMUNES

<130> caso 21907

<150> US 10/267.844

<151> 2002-10-08

10 <150> US 10/264.965

<151> 2002-10-04

<160> 90

15 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3597

<212> DNA

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25	ggcgaatgga gcagggggcgc gcagataatt aaagatttac acacagctgg aagaaatcat	60
	agagaagccg ggcgtggtgg ctcatgccta taatcccagc acttttggag gctgaggcgg	120
30	gcagatcact tgagatcagg agttcagagc cagcctgggtg ccttgccatc tcccaatggg	180
	gtggctttgc tctgggctcc tgttccctgt gagctgcctg gtcctgctgc aggtggcaag	240
35	ctctgggaac atgaaggctc tgcaggagcc cacctgcgtc tccgactaca tgagcatctc	300
	tacttgcgag tggaaagatga atggctccac caattgcagc accgagctcc gcctgttgta	360
	ccagctgggt tttctgctct ccgaagccca cacgtgtatc cctgagaaca acggaggcgc	420
40	gggggtgcgtg tgccacctgc tcatggatga cgtggtcagt ggggataact atacactgga	480
	cctgtgggct gggcagcagc tgctgtggaa gggctccttc aagcccagcg agcatgtgaa	540
45	acccagggcc ccaggaaacc tgacagttca caccaatgtc tccgacactc tgetgctgac	600
	ctggagcaac ccgtatcccc ctgacaatta cctgtataat catctcacct atgcagtcaa	660
	catttgaggt gaaaacgacc cggcagattt cagaatctat aacgtgacct acctagaacc	720
50	ctccctccgc atcgagcca gcacctgaa gtctgggatt tcctacaggg cacgggtgag	780

55

60

65

ES 2 279 916 T3

	ggcctgggct cagtgtctata acaccacctg gagtgagtgagg agccccagca ccaagtggca	840
5	caactcctac agggagccct tcgagcagca cctcctgctg ggcgtcagcg ttctcctgcat	900
	tgtcatcctg gccgtctgcc tgttgtgtcta tgtcagcatc accaagatta agaaagaatg	960
10	gtgggatcag attcccaacc cagcccgag cgcctcgtg gctataataa tccaggatgc	1020
	tcaggggtca cagtgggaga agcgggtccc aggccaggaa ccagccaagt gccacactg	1080
	gaagaattgt cttaccaagc tcttgccctg ttttctggag cacaacatga aaagggatga	1140
15	agatcctcac aaggctgcca aagagatgcc tttccagggc tctggaaaat cagcatgggtg	1200
	cccagtggag atcagcaaga cagtccctctg gccagagagc atcagcgtgg tgcgatgtgt	1260
20	ggagttgttt gagggccccg tggagtggtga ggaggaggag gaggtagagg aagaaaaagg	1320
	gagcttctgt gcatcgctg agagcagcag ggatgacttc caggagggaa gggagggcat	1380
25	tgtggccccg ctaacagaga gcctgttctt ggacctgttc ggagaggaga atgggggctt	1440
	ttgccagcag gacatggggg agtcatgctt tcttccacct tcgggaagta cgagtgtctca	1500
	catgccctgg gatgagttcc caagtgcagg gcccaaggag gcacctccct ggggcaagga	1560
30	gcagcctctc cacctggagc caagtccctc tgccagcccc acccagagtc cagacaacct	1620
	gacttgcaaa gagacgcccc tcgtcatcgc aggcaccctt gcttacgca gcttcagcaa	1680
35	ctccctgagc cagtcaccgt gtcccagaga gctgggtcca gacctactgc tggccagaca	1740
	cctggaggaa gtagaaccgg agatgccctg tgtccccag ctctctgagc caacctactgt	1800
40	gccccaaact gagccagaaa cctgggagca gatcctccgc cgaaatgtcc tccagcatgg	1860
	ggcagctgca gccccgtct cggccccac cagtggctat caggagtttg tacatgcggg	1920
45	ggagcagggg ggcacccagg ccagtgcggg ggtgggcttg ggtccccag gagaggctgg	1980
	ttacaaggcc ttctcaagcc tgcttgccag cagtgtctgt tccccagaga aatgtgggtt	2040
	tggggctagc agtggggaag aggggtataa gcctttccaa gacctattc ctggctgccc	2100
50	tggggacctt gcccagtcct ctgtcccctt gttcaccttt ggactggaca gggagccacc	2160
	tcgcagtcct cagagctcac atctcccaag cagctcccca gagcacctgg gtctggagcc	2220
55	gggggaaaag gtagaggaca tgccaaagcc cccacttccc caggagcagg ccacagacct	2280
	ccttggtggac agcctgggca gtggcattgt ctactcagcc cttacctgcc acctgtgcgg	2340
60	ccacctgaaa cagtgtcatg gccaggagga tgggtggccag acccctgtca tggccagtc	2400
	ttgctgtggc tgctgtctgt gagacaggtc ctgcgccctt acaaccccc tgagggcccc	2460
65	agacccctct ccagggtggg ttccactgga ggccagtcgt tgtccggcct cctggcacc	2520

ES 2 279 916 T3

5 ctcgggcatt tcagagaaga gtaaatactc atcactcttc catcctgccc ctggcaatgc 2580
 tcagagctca agccagaccc ccaaaatcgt gaactttgtc tccgtgggac ccacatacat 2640
 gaggggtctc taggtgcatg tccctcttgtt gctgagctcg cagatgagga ctagggtcta 2700
 tccatgcctg ggaaatgcca cctcctggaa ggcagccagg ctggcagatt tccaaaagac 2760
 10 ttgaagaacc atggtatgaa ggtgattggc cccactgacg ttggcctaac actgggctgc 2820
 agagactgga ccccgcccag cattgggctg ggctcgccac atcccatgag agtagagggc 2880
 15 actgggtcgc cgtgccccac ggcaggcccc tgcaggaaaa ctgaggccct tgggcacctc 2940
 gacttgtgaa cgagttgttg gctgctccct ccacagcttc tgcagcagac tgtccctgtt 3000
 gtaactgccc aaggcatgtt ttgcccacca gatcatggcc cactgtggagg cccacctgcc 3060
 20 tctgtctcac tgaactagaa gccgagccta gaaactaaca cagccatcaa gggaatgact 3120
 tgggcggcct tgggaaatcg atgagaaatt gaacttcagg gaggggtggc attgcctaga 3180
 25 ggtgctcatt catttaacag agcttcccta ggttgatgct ggaggcagaa tcccggtctg 3240
 caaggggtgt tcagttaagg ggagcaacag aggacatgaa aaattgctat gactaaagca 3300
 30 gggacaattt gctgccaaac acccatgccc agctgtatgg ctggggggctc ctcgatgca 3360
 tggaaacccc agaataaata tgcctcagcca cctgtgggc cgggcaatcc agacagcagg 3420
 35 cataaggcac cagttacctt gcatgttggc ccagacctca ggtgctaggg aaggcgggaa 3480
 ccttgggttg agtaatgctc gtctgtgtgt tttagtttca tcacctgtta tctgtgtttg 3540
 40 ctgaggagag tggaaacagaa ggggtggagt tttgtataaa taaagttctt ttgtctc 3597

<210> 2

<211> 2478

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

50 atgggggtggc tttgctctgg gctcctgttc cctgtgagct gcctggctct gctgcagggtg 60
 gcaagctctg ggaacatgaa ggtcttgtag gagccacct gcgtctccga ctacatgagc 120
 55 atctctactt gcgagtggaa gatgaatggt cccaccaatt gcagcaccga gctccgctg 180
 ttgtaccagc tgggttttct gctctccgaa gccacacgt gtatccctga gaacaacgga 240
 ggcgcggggg gcgtgtgcca cctgctcatg gatgacgtgg tcagtgcgga taactatata 300
 60 ctggacctgt gggctgggca gcagctgctg tgggaagggt ccttcaagcc cagcgagcat 360
 gtgaaaccca gggccccagg aaacctgaca gttcacacca atgtctccga cactctgctg 420
 65 ctgacctgga gcaaccgta tccccctgac aattacctgt ataactctt cacctatgca 480

ES 2 279 916 T3

	gtcaacattt ggagtgaaaa cgacccggca gatttcagaa tctataacgt gacctaccta	540
	gaaccctccc tccgcacgc agccagcacc ctgaagtctg ggatttccta cagggcacgg	600
5	gtgagggcct gggctcagtg ctataacacc acctggagtg agtggagccc cagcaccaag	660
	tggcacaact cctacagga gcccttcgag cagcacctcc tgctgggctg cagcgtttcc	720
10	tgcatgtca tccctggcct ctgcctgttg tgctatgtca gcatcaccaa gattaagaaa	780
	gaatggtggg atcagattcc caaccagcc cgcagccgcc tcgtggctat aataatccag	840
	gatgctcagg ggtcacagtg ggagaagcgg tcccagggcc aggaaccagc caagtgccea	900
15	cactggaaga attgtcttac caagctcttg cctgttttc tggagcaca catgaaaagg	960
	gatgaagatc ctacaaggc tgccaaagag atgcctttcc agggctcttg aaaatcagca	1020
20	tgggtcccag tggagatcag caagacagtc ctctggccag agagcatcag cgtggtgcga	1080
	tgtgtggagt tgtttgaggc cccggtggag tgtgaggagg aggaggagg agaggaagaa	1140
	aaaggagct tctgtgcac gccctgagagc agcagggatg acttccagga gggaaggag	1200
25	ggcattgttg cccggctaac agagagcctg ttccctggacc tgctcggaga ggagaatggg	1260
	ggcttttgcc agcaggacat gggggagtca tgccttcttc cacttcggg aagtacgagt	1320
30	gctcacatgc cctgggatga gttcccaagt gcagggccca aggaggcacc tccctggggc	1380
	aaggagcagc ctctccacct ggagccaagt cctcctgcca gcccgaccca gagtccagac	1440
	aacctgactt gcacagagac gccctcgtc atcgcaggca acctgctta ccgcagcttc	1500
35	agcaactccc tgagccagtc accgtgtccc agagagctgg gtccagacc actgctggcc	1560
	agacacctgg aggaagtaga acccgagatg cctgtgtcc cccagctctc tgagccaacc	1620
40	actgtgccc aacctgagcc agaaacctgg gacagatcc tccgccgaaa tgcctccag	1680
	catggggcag ctgcagcccc cgtctcggcc cccaccagtg gctatcagga gtttgtacat	1740
	gcgggtggagc aggggtggcac ccaggccagt gcgggtggtg gcttgggtcc cccaggagag	1800
45	gctggttaca aggccttctc aagcctgctt gccagcagtg ctgtgtccc agagaaatgt	1860
	gggtttgggg ctacagtggt ggaagagggg tataagcctt tccaagacct cattcctggc	1920
	tgccctgggg acctgcccc agtcctgtc ccttgttca cctttggact ggacagggag	1980
50	ccacctcgca gtccgcagag ctcatcttc ccaagcagct cccagagca cctgggtctg	2040
	gagccggggg aaaaggtaga ggacatgcca aagccccac ttcccagga gcaggccaca	2100
55	gaccccttg tggacagcct gggcagtggt attgtctact cagcccttac ctgccacctg	2160
	tgccggccacc tgaacagtg tcatggccag gaggatggtg gccagacccc tgtcatggcc	2220
	agtccttgct gtggctgctg ctgtggagac aggtcctcgc cccctacaac cccctgagg	2280
60	gcccagacc cctctccagg tgggggtcca ctggaggcca gtctgtgtcc ggcctccctg	2340
	gcacctcggt gcatctcaga gaagagtaaa tctcatcat ccttccatcc tgccctggc	2400
	aatgctcaga gctcaagcca gacccccaaa atcgtgaact ttgtctccgt gggaccaca	2460
65	tacatgaggg tctcttag	2478

ES 2 279 916 T3

	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
10	<400> 3	
	ccacacgtgt atccctgaga a	21
15	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
25	<400> 4	
	tctcagggac acacgtgtg	19
30	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
40	<400> 5	
	tggagtgaac acgacccggc ag	22
45	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
55	<400> 6	
	ctgccgggtc atttcgctc c	21
60	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	

ES 2 279 916 T3

	<400> 7	
	gaggggaaggg agggcattgt g	21
5	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
15	<400> 8	
	agggaagggc gggcattgt	19
20	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
30	<400> 9	
	ctctccgagc aggtccagg	19
35	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 10	
45	tcctggacct tctcgagag g	21
	<210> 11	
50	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 11	
60	aaggtggaag aagcatgac tcc	23
	<210> 12	
	<211> 23	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 279 916 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
5	<400> 12	
	aaggtgggag aagacatgac tcc	23
10	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 13	
20	ggagtcacgt cttctctac ctt	23
	<210> 14	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 14	
35	tggctcagag agttgctgaa gc	22
	<210> 15	
40	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 15	
50	ttcagcaacc ccctgagcc	19
	<210> 16	
	<211> 20	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 16	
65	agtggctatc aggagtttgt	20
	<210> 17	
	<211> 20	

ES 2 279 916 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 17	
10	agtggtatc gggagttgt	20
	<210> 18	
	<211> 21	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
	<400> 18	
25	ctcttctctg agatgccga g	21
	<210> 19	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4R	
35	<400> 19	
40	ctcgggcatc ccagagaaga g	21
	<210> 20	
	<211> 8	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencias utilizada para la determinación de las frecuencias de los haplotipos estimados informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos	
50	<400> 20	
55	acatttat	8
	<210> 21	
	<211> 8	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencias utilizada para la determinación de las frecuencias de los haplotipos estimados informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos	

ES 2 279 916 T3

	<400> 21	
	acagttgt	8
5	<210> 22	
	<211> 8	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencias utilizada para la determinación de las frecuencias de los haplotipos estimados informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos	
15	<400> 22	
	acctccgt	8
20	<210> 23	
	<211> 8	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencias utilizada para la determinación de las frecuencias de los haplotipos estimados informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos	
30	<400> 23	
	gcagttat	8
35	<210> 24	
	<211> 8	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencias utilizada para la determinación de las frecuencias de los haplotipos estimados informáticamente comparadas entre filipinos control y diabéticos	
45	<400> 24	
	gccgccgt	8
50	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
60	<400> 25	
	cagccctgt gtctgcaga	19
65	<210> 26	
	<211> 20	

ES 2 279 916 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
	<400> 26	
10	ctgacctgga gcaaccgta	20
	<210> 27	
	<211> 25	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
	<400> 27	
25	attgtgtgag gaggaggagg aggta	25
	<210> 28	
	<211> 17	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
35	<400> 28	
40	ctcgtcatcg caggcaa	17
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
50	<400> 29	
	gccgaaatgt cctccagca	19
55	<210> 30	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
65	<400> 30	
	ccggcctccc tggca	15

ES 2 279 916 T3

	<210> 31	
	<211> 26	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
10	<400> 31	
	gtccagtgtg tagttatccg cactga	26
15	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
25	<400> 32	
	actgggcctc tgctgtgca	19
30	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
40	<400> 33	
	gttgggcatg tgagcactcg ta	22
45	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
55	<400> 34	
	agggcacctc gggttcta	18
60	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	

ES 2 279 916 T3

	<400> 35	
	ccacatttct ctggggacac a	21
5	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
15	<400> 36	
	gcagactcag caacaagagg	20
20	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
30	<400> 37	
	ccacacgtgt atccctgaga a	21
35	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 38	
45	tggagtgaag aacgacccggc ag	22
	<210> 39	
50	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 39	
60	gaggggaaggg agggcattgt g	21
	<210> 40	
	<211> 19	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 279 916 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
5	<400> 40	
	ctctccgagc aggtccagg	19
10	<210> 41	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 41	
20	aaggtggaag aaggcatgac tcc	23
	<210> 42	
25	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 42	
35	aaggtgggag aagacatgac tcc	23
	<210> 43	
40	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 43	
50	tggtcagag agttgctgaa gc	22
	<210> 44	
	<211> 20	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
60	<400> 44	
	agtggctatc aggagttgt	20
65	<210> 45	
	<211> 21	

ES 2 279 916 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 45	
10	ctcttctctg agatgcccga g	21
	<210> 46	
	<211> 19	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 46	
25	tctcaggac acacgtgtg	19
	<210> 47	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
35	<400> 47	
40	ctgccgggtc atttcgctc c	21
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
50	<400> 48	
	agggaagggc gggcattgt	19
55	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
65	<400> 49	
	tcctggacct tctcgagag g	21

ES 2 279 916 T3

	<210> 50	
	<211> 23	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
10	<400> 50	
	ggagtcacgt cttctcctac ctt	23
15	<210> 51	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
25	<400> 51	
	ttcagcaacc ccctgagcc	19
30	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 52	
40	agtggctatc gggagtttgt	20
	<210> 53	
45	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de hibridación	
	<400> 53	
55	ctcgggcatc ccagagaaga g	21
	<210> 54	
	<211> 21	
60	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	

ES 2 279 916 T3

	<400> 54	
	ccacatttct ctggggacac a	21
5	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
15	<400> 55	
	attgtgtgag gaggaggagg aggta	25
20	<210> 56	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
30	<400> 56	
	attgtgtgag gaggaggagg aggta	25
35	<210> 57	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
45	<400> 57	
	ttccaggagg gaaggga	17
50	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
	<400> 58	
60	caccgcatgt acaaactcct	20
65	<210> 59	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 279 916 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
5	<400> 59	
	ggtgactggc tcagggga	17
10	<210> 60	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
	<400> 60	
20	ttccaggagg gaagggc	17
	<210> 61	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
	<400> 61	
35	caccgcatgt acaaactccc	20
	<210> 62	
40	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de PCR específico de alelo	
	<400> 62	
50	ggtgactggc tcagggg	17
	<210> 63	
	<211> 18	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
	<400> 63	
65	aacattgtcc cccagtgc	18
	<210> 64	
	<211> 20	

ES 2 279 916 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
	<400> 64	
10	agcactgggg aacaatgttc	20
	<210> 65	
	<211> 20	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
	<400> 65	
25	ttctactcac gtgctgacct	20
	<210> 66	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
35	<400> 66	
	ggtcagcaca tgagtagaac g	21
40	<210> 67	
	<211> 19	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
50	<400> 67	
	tcaattgaac cgtccctcg	19
55	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda utilizada para la identificación de polimorfismos de IL4 e IL13	
65	<400> 68	
	gaggacagt tcaactgaaa c	21

ES 2 279 916 T3

	<210> 69	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
10	<400> 69	
	actaggcctc acctgatacg a	21
15	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
25	<400> 70	
	ctcggacatg caagctggaa	20
30	<210> 71	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
40	<400> 71	
	aatcgaggtg gcccgatttg ta	22
45	<210> 72	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
55	<400> 72	
	catagaggca gaataacagg caga	24
60	<210> 73	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	

ES 2 279 916 T3

	<400> 73	
	actgaatgag acagtcctg ga	22
5	<210> 74	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
15	<400> 74	
	cctaaccctc cttccgcct a	21
20	<210> 75	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
30	<400> 75	
	actgacttat ctttactgtc acttet	26
35	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
45	<400> 76	
	gcaagacagc caccaacc	19
50	<210> 77	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
60	<400> 77	
	tgacttatct ttactgtcac ttcc	24
65	<210> 78	
	<211> 0	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 279 916 T3

	<400> 78	
	000	
5	<210> 79	
	<211> 18	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
15	<400> 79	
	cctgctccca ggactgac	18
20	<210> 80	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
30	<400> 80	
	cccagacttt atctgtgact gctc	24
35	<210> 81	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
45	<400> 81	
	cctgctccca ggactgat	18
50	<210> 82	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
60	<400> 82	
	ggaacaggc ccgtaga	17
65	<210> 83	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 279 916 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
	<400> 83	
5	gagtgccgct acttggcc	18
	<210> 84	
10	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
	<400> 84	
20	gaaacaggcc cgtagc	16
	<210> 85	
	<211> 22	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
	<400> 85	
35	tctggaggac ttctaggaaa ac	22
	<210> 86	
	<211> 18	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
45	<400> 86	
	tcgagccatg tcgccttt	18
50	<210> 87	
	<211> 22	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador del amplicón	
60	<400> 87	
	tctggaggac ttctaggaaa at	22
65	<210> 88	
	<211> 130020	
	<212> DNA	

ES 2 279 916 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 88

5	aagcttcact ctcacgctct gtggtgtgac atccactcag caaagaggtg caaacctgga	60
	ccccagagt gtgaatcaca gacacctctt ataccccagc ccctctgctg ggaatctagc	120
10	ggcagaaact cccgagctca tgggcggggc ctctctgagg gcaggetccc ttgcagcct	180
	gtgtttgcct ctggggccgc tttgggtaca cacatacaca cacacacaca cacacacaca	240
15	ccatgccaaa gccacctccc aggcccttcc atgccctgcc tagttctgtt ttgttttggt	300
	tgagacggag tctcactctg acgcccaggc tggagtgcgg tggcatgac ttggtcatt	360
	gcaacctctg tctcccaggt tcaaacaatt ctctgcctc agcctcccga gtagccggga	420
20	ttacgggcgt gtgccaccac gcccgcaaa tttttttgta tttttagtag agatgggggt	480
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 279 916 T3

	tcaccatggt gccaggtg gtctgaaca cctgacctca aacgatccac ctgcctcagc	540
	ttcccaaaagt gctgggatta gaggcgtgag ccacagtgcc tggccctgc cctggttctt	600
5	gttttgtggt ttgagatgag gtctcgctat attgcccagg ttggtcttaa agccccaggt	660
	tcaagcaatc ctctgcctc agccttccaa agtggttgaa ttacaggcat gagccacctc	720
10	gcctgccac ctgcctaata tctgaactca cagataaaac tgctcccacc aaccaggccc	780
	tctgcccct gggaccccc tctacctca gcctggaggg aaattccagg cctccctgga	840
	gcttatgaag gggaaaaaac ccaagagggg ttttttttc tgtaactcag tgctgctcat	900
15	tcgcctcatt atggggtcag gatcccagaa agtcagggtt aaaaggacat ttgctctaca	960
	aataggaag ctgtcccaga ggtaggtatg cctcatccat ggteacacag atgggcagag	1020
	ctgagccgga acacgaaccc agaagtcccg ggtcccagcc tagctcctc aatacctctc	1080
20	aaacctatta tcaacctttc acactttagt aaaaaatagc gcaactcaa acagaactct	1140
	aagggtgagt gaggacatag gccaggtcag atctgatgga aggaggagag ctggcccaga	1200
	gggcagggag taggggaccc agcccctacc tataatccta gcactttggg aggccaaaggc	1260
25	aagtggatcg ctggagccca ggagttcgag actggcctgg gcaacatggc aagatccccg	1320
	tctctactaa aaatacaaaa attagctggg tgtagtgggt tacacctgtt gtcccagcta	1380
30	cacgggaggc tgaggtggga ggatcacctg agcccagaga ggtcagggtc gcggtgagct	1440
	aagattgagt gccaccctaa gcctgggggc ccaggatact cactgctctc agccaggaga	1500
	aagctgccac actcctggga gtagttgcca gactggctctg tgatgttgac actgaaaatg	1560
35	tcgtcggcca tgaagtggaa tacatccatg tggcaggtgt aggtggcatg cgtggcattg	1620
	tgggcccagc tgtggaggct gcaggaggtg gcctcgtcct tcagctcttc atactggctc	1680
	tgccctcaag gacaaagcag ccggtcatgg ctggaagcca ggggcagggg ggatgggtgt	1740
40	gggctcagtg ctcagggccca gggcagaagc ccagactctc agggctggga gggatttgag	1800
	gcagggtctg ggggtgggtc cctgggtccaa ccaacctttt cccagggaag gtatcacctc	1860
	ccctacagca tctcaatga attgtgtccg ggctcagctt gcacacctcc caggggccag	1920
45	gaactcacta cctcatttag ggcagcagct ctcaattttg gaaatttggg ccattcttgc	1980
	ttggactaag cetaaatctg tccctgttgg tcccaacaac cagatggctg tctgcagga	2040
	agggcgctag gcattttggg tttccttctc tcttttctgt ccaacatcca tttttttgag	2100
50	acagggtctc actctggccc caggctggag tatagtagtg tgatcatggc ttactgcagc	2160
	ctcgaccttc ccaggctcag ctgatcctcc cacctcagcc tctcagtag ctgggactac	2220
55	atgcatgcac caccatgccc agctaacttt ttgtattttt tgtagagatg gggccccacc	2280
	atgttgctta ggctggcttc aaactcctgg gctcaagtga tctgccagcc ttggcctccc	2340
	aaagtgtctg gattacagga ctgagccacc tcgcccagtc cccaaatcca ctgaatatct	2400
60	aataatagcc tgtgctgagg gccaggaaaa gagctaaatg aacctcatct cctcctctgg	2460
	gtggacttct gggaaagtgt gtgggatggg attagggaaa atgctgtggc tttttaactc	2520
	ccactggaca aaaatgatgg gttttgaagt atgtatagta gtttaccgga tattaatttc	2580
65	cctacctaga tggtcaggat ctgaacatga ccactctcta ggcccagtag ggatgtgtgg	2640

ES 2 279 916 T3

	actgagttct	ctgccaaatt	tgctggaata	caagttcctg	ctgaataaat	gctctccaag	2700
5	cctcccagcc	tgaacttgct	ccttatcccc	cctcacctgc	ctcactccac	tccagccaca	2760
	ctgacctcct	ccctatctct	caaacgcacc	agctcttctc	ccacagggcc	tttgcaactgg	2820
10	cagtgccttc	tgcccagctc	cctggcttcc	tccttctcac	tagcagttgt	ggctcccttta	2880
	cctgaggtec	agtgttctgt	ccttgatata	gcacccagta	ttattagaaa	gtatcctggt	2940
	tggggcagaa	cacgggtggct	tatgcctgta	atcccaacac	tttgggaggg	tggccatgcy	3000
15	gcagaccggc	catccccggg	tctcaaaaacc	atgggcgacc	tgtgtgggcy	agagagtggc	3060
	ctttgaagct	gggtggataga	ccaaccctgc	gggctcctga	cttttcaagt	cctgtgagcc	3120
20	ctgagtgggt	gtctgaaagg	cgggtacagt	gggcggatca	cttgaggcca	ggagtccgag	3180
	accaggtggg	ctaacatgac	aaaaccctgt	ctctacttaa	aatacaaaaa	ttagccaggg	3240
25	atgggtgggc	acacctggat	gcaatcccag	atacttggga	ggttgaggca	ggagaattgc	3300
	ttgaacccag	gaggtggagg	ttgcagttag	ccgagatcat	gccaccgcac	tccagcctgg	3360
	gcaacagagt	gagactccgt	ctccaaaaaa	aagaaagaaa	gaaagtgtcc	tgtttggggc	3420
30	tggcatgggt	gctcacacct	gtaatcccag	cactttggga	ggctgagggt	ggcagattgc	3480
	ttgagcccag	gagtttgaat	ccagcctggg	taacatggca	aaaccctgtc	tttacaaaaa	3540
35	ctacaaaaat	tatccaggta	tggtgatgca	tgcctgtagt	cccagctact	caggaggctt	3600
	aggtggaggg	attgcttgag	cccaggaggt	caaggctaca	gtgagttctg	atcccaccac	3660
40	tgcactccag	cctgggcaac	agagcaagac	cctgtctcaa	aaaaataaaa	taaaataaaa	3720
	taaaataaaa	taaaaaagag	aaagcacctt	gttggttggt	ttgtgtgtct	gtctcccca	3780
45	gcctccgccc	caccgtggta	cgtcagttcc	aaggcatctg	gggcctggtc	agtcttgctc	3840
	tgttgaatcc	ccagtgcctg	caacagtgtc	tggcaggaac	ttaatacatg	ttttgttttg	3900
	ttttgttttg	tttttgagtt	gggatcttgc	ttttttgccc	aggctggagt	gcagtggcgt	3960
50	gatcatagct	cactgcagcc	tcgacctcct	gagcttggtc	ccctgcctt	agactctcaa	4020
	gtagctggga	ttacaggatt	gtgccaccac	gcccgaactga	tttatttttt	gtagagacag	4080
55	ggttttgtga	tgttgcccag	gctggtctca	aactcctggg	ctcaagtgat	cctccttcc	4140
	tggcctccca	aagtgtctgg	gttagaaaca	tgagccactg	cacctggcct	ataaatgggt	4200
60	ttgaatgaat	gaatgagctg	atggataaca	gaagctcttc	tttatcctga	gctgcatagg	4260
	gtctaaaagg	gacccatgga	ctttggagtt	gggcggctct	aatttgaatc	ccagctccag	4320
	cattcactgg	ctgtgtgacc	ttaggcaagt	tgtttaacct	ctctgaacct	caatgtcctc	4380
65	atctgtaaaa	tgggagtaat	cattgtgagg	gttgggggtg	accattcatg	ggaagcgtgt	4440

ES 2 279 916 T3

	agttgggggc ctggtacctt agtgcttgaa aaatcatgcg ggaaaccagc catccccggg	4500
5	tctcaaaaacc atggccgacc tgtgtgggtg agagagtggc ctttgaagct ggtggataga	4560
	ccaaccctgc gggctcctga cttttcaagt cctgtgagcc ctgagtgggt gtctgaaagg	4620
10	cggacacagt ggtcctcagt gcacagtgtc ctectggggg aatcactgag caggcacccct	4680
	gaattgcac cccggggact ggtgaggccc ggtacttac caggtaaggg tgagcgtgct	4740
15	ggggtggagg ttccacattt ccaggatgca gatgaccgtc tggaggtaat cgggtgtagca	4800
	gacgagggtcg gggcagcccc agcctggagg gtcagtgggg agagaggcct tgggtgggggg	4860
20	tggcttggga ctgcagagct tectctccat cccctcgagg gctggaggaa gaatgggtgc	4920
	aggggtcccc aggcggggac aaatatgagg actcaggagc tgcttagatg taggcctggc	4980
25	accagggggg cctcaccacc tggaaattcc ttgtttgagc accaatgttt caaggctggc	5040
	tatgaagaca ggatgcatgt gatggcaaat aatataaaac tagctgggtcc ccagctcagc	5100
30	acctcctcc agagccctgc gcccgccac cagggtctgt tccctcctgg ccaagctccc	5160
	actcagaatg gcaatatcct aaatgcccc gatgtggtag gaaccagcc agagcacacg	5220
35	cacacacccc aagaggggtca ggacctcata gagtcaagga cagctatgct gaaaatgtcc	5280
	caaaaccctg acaaggaaga ggactcggct ctacagaagt tggatccaca ggacaccac	5340
40	tctcggagat tcaggaagtg cttcaaggag taggaaaccg tgagagaatt aaaaagccct	5400
	cggacacttt tgcataaagg tctgctgat cctgcggcca aaaatgccac cgccaccaag	5460
45	aagtcttcta ggtattgcc tatgaggcaa ttttgttgga agatttaaca cttttccatc	5520
	ctgctcccca aacattaatt gtttcgctgt gttctaaaac aggggtgcaa tcatcatcta	5580
50	cattttgtta aatgtggaca aaatcaatgg aataatttgt agctttgttt tgtatatctg	5640
	agtgccaat ccactatttt ttgctgctat ttactagaaa cttgtaccgc tcacctcttt	5700
55	ttgagatagg atctcttgct ctgttgccca ggctggaatg cagtgggtgc atctcagctc	5760
	actgcagcct ccacctcctg ggctcaagca gtcctccac ttcaacttcc tgagtagctg	5820
60	agactacagt tgtgcaccac catgcctgga taatttttgt gttttttag agacaggggt	5880
	tcaccatggt gccaggtg gtctcaatct cctgagctca agcgatccac ctgcctcagc	5940
65	ctcccaaagt gctgggattg taagaatgag ccatcggtgc tgacctgtt ccccttttta	6000
	agtaggttca tttttgggtg ctttttcccta ttttccctgg actaatgaag accttgagg	6060
	tgggtgggtg agattccctt cctgggtctc actctaggac agaacctata tgcggagcca	6120
	agaatactgt gtctggaaat atcctttagt tcattgtaga gatgagaaca ctgaggctcc	6180
	aagactagac catgcctctt gtctctcttg gtctgggtcg ctgagacact caccagggga	6240

ES 2 279 916 T3

5 aggaaatacc tagtctgtgc tagtttttca tagccgcaca catgacagat attgctaattg 6300
 gatcacagca ctccctcccc taggtgtgac ctcggaatgc ttctcaactt ctctcgaggc 6360
 agtggctacc aagggatctg agtcatggaa gttaaattctt ctctaggagg gggcttttct 6420
 caggagagaca cacagaactt gtcgggtggag tgaaaaggag ctagtccag cacttggtgg 6480
 10 agaaaacagg actgattttg gcaaaacctc aacacagagc ctctaagtag ctgtgtcatc 6540
 tctgagtctg tatectctg gttctttctc agagctcttg gaatttgagg aggagctacc 6600
 15 attcctagcc aggtctaaag ctaccaaggg acagggtttg tctccaaact tggggaggca 6660
 acggcagccc ctgagtggca gggagggtggc accagggatg agagggtggg aaaatgcctt 6720
 20 gtcagtaccc cagccacagg gcagagagcc ccagggccat cccatgtctg gggttatgaa 6780
 agcgtgcagg aggcagtgag aggtgcacaa agtagctctg tgactgcaaa catgtgactc 6840
 aaaactgctt ctctctccca tgtgtaagcc ggagacactg cttgccctag aggtctgtga 6900
 25 ggtgttgaga tgagatcatg cctgtgctg catgctgccc gcacatggct atcactccac 6960
 agatagcagc acagcatggt gaaggccgtg ctacggtttg acgtctgtgt ctcccagaa 7020
 30 actcagttgc caatgtgatc atattaaaag gtggggactc taggagatga ttaagtcag 7080
 ggggcagagc cccctgaat gaattattga tgctataaga gggctggacg aacccaacat 7140
 35 tcagaccctt tttgcccttc tgccatgtga ggatgcagcg tgtgtccct ctgggggtgg 7200
 tgcagcgttc aatgtggcat cttaaaggca aagatggggg ctgggtgcgg taatcccagc 7260
 acttttgga ggccgaggcg ggtggatcat ttgaggtcag gaggttcaaga ccatcctggc 7320
 40 caacatggtg aaaccccaac tctactaaaa atacgaaaat tagccatggc atgtgcctgt 7380
 tateccagct gctcgggagg ctgaggcatg agaattgctt gaacctggga ggcagagggt 7440
 45 gcagtgagcc aagattgcac cattgcactc cagcctgtgt gagaaagcaa ggctcagtt 7500
 caaaaaaaaa aagcaaagat gggccctca ccggaatcaa agctactgct ggtgccttga 7560
 50 tcttggaactt ccagcctcc agaactgca gcagtaaatg tctattattt ataaattacc 7620
 cagtctcag tattcagtta cagcagcaca gacagactaa gacagacccc aagagcaaac 7680
 55 tgatcccagc tctgcctctt ccgggtagtg tggccatgca cctgtctctt agcctctctg 7740
 agcctcctca gccaaaaaac tgggcgtcat tacaacatgc gccttggtgg gctgttgga 7800
 60 cagtggaaatg ggatgacgt ccgagctttg catgcagcca gggcttggtt tctgcacccg 7860
 ccagatgtgg agccatggtg ggtgacccaa aggccttttta gaaccaagat gaggatgctt 7920
 gccactcaga aagggaatat caaagcttga catctgttct ctgaaggagc tatttgaggt 7980
 65 cctgggtctt ctggtaaaaa ccagagaaaa atgcccatga gtcagcagag cagctgttga 8040

ES 2 279 916 T3

	gttcctcccc	tgcccctagg	ccggcctcca	cacaagtctg	tgctggatcc	cgcctcctca	8100
5	tgccccctc	ctccaggaag	ccctccagga	tctcttagtc	ctaggcagtg	ccctttcagt	8160
	cggactcctg	gtcttcccag	ttctgctttc	taacgtcacc	ccctctaacc	acaacatctg	8220
10	gtcctctggg	ggctgcctac	caagggttcag	tctccttttg	gctcttcttc	ctgtccccag	8280
	cccagggacc	accagtgcct	gctaagaatc	tagcgatttt	tttgtttggt	tattgttggt	8340
15	gttggtgctg	ttgttttgag	acaggggtctc	gctctgttgc	ccaggctgga	gtacagttgt	8400
	caccttgact	cactgtaacc	tccacctccc	aggctcaagc	aatcctcccg	cctcagcccc	8460
20	acaaaaagct	gagactacaa	gcatgcgctc	ctatgcctgg	ctaatttttt	ttcttttgta	8520
	gagacagggc	ttcaccatgt	tgcccaggct	ggtcttgaga	tcctgagctc	aagcgaccta	8580
25	ccctcctcag	cctcccaaag	ggctgggatt	ccagtaggag	ccaccgcacc	cggtgcagca	8640
	attgttgaaa	aacattttcca	aggagagtca	ttacataagg	agaaactgag	gttagatgga	8700
30	aggcagaact	tcctcactca	gagagttggg	agccagccaa	ggcagaggtc	aggggaaatg	8760
	aaggacgaag	cctttcatcc	ccccagtgac	acccgaagac	acaagcctgt	gggctgggcc	8820
35	acctgagact	catgtctacc	gcttctgttt	catggagccc	tttggtggat	ggattctgat	8880
	tagtggagag	ccggctactg	gactcgtgtc	agcctcaagg	gcatggatgt	catcttttct	8940
40	gaatctgtgg	actctagccg	tgtttttgag	cccagaaagc	cagcccggcc	ctggctcagc	9000
	tctgtgatgg	gggcccctcc	caccgcgaga	ccacggggca	gccacttacc	tccctggagc	9060
45	agcagcagga	gcaagggggc	ggcccagcca	cgcggcatgc	tgactcccac	gggcctgcaa	9120
	gagacgtaca	gtggaggggtg	agccaggcgg	gctcagggct	cccccgccct	ccccctcatc	9180
50	ctgtctcttc	ccaggcagac	ttgccccga	ttcttggaac	tgtcttaaga	aaaatgcaag	9240
	atcccgaggg	gcctgtggat	gaccccaaga	actcccacct	cttagaaatg	gcagattcac	9300
55	cccaagaatc	ccttctccca	ccttcttctc	gccccgcgcc	catcacgtca	caaatgcaaa	9360
	gtgaatttgt	tttattatct	tattttaata	tttttagaga	tggggtcattg	ttctgttgcc	9420
60	caggctggag	tgcaatggcg	caatcacggc	tcactgcagc	ctcaacctcc	tgggtcgaag	9480
	cgatcctcct	gcatcagcct	cccgagtagc	tgggaccaa	ggcacgtgcc	accacgcctg	9540
65	gctaattttt	aaaacatttt	tgtagaggcg	gcatcttgc	atgttgccca	ggctggcttc	9600
	aaactcctgg	gatcacatga	tcctcctacc	tcggcctctc	aaagtgcctg	gatgacaggc	9660
	atgagtcacc	acgcccagca	caagggtgaat	ttaaagaggg	aggagactgc	tgactatttt	9720
	gcccttgcctg	agcctattga	tgtagcattg	tgtgtgaaat	taaacttgctg	tatttatcta	9780
	tctaacaaag	aaagagggag	ggaaaaagag	aggaagggag	agagaaaagg	agaaaaaact	9840

ES 2 279 916 T3

agtttggaaa ggggatctg ctgaggagca attttggatc ttccttccta taaacatcca 9900
 5 tgttgtaaaa aaaagccagt aaattggctt ttttatgttt atttttttaga caaagtctca 9960
 ctctatcgcc caggctggag tgcagtggcc cgatcttggc tcaactgcaac ctctacctcc 10020
 caggttcaag cgattctcct gcctcagctt cccaagtagc tgggaatata ggtggccgcc 10080
 10 accacgcctg gctaattttt gtatttttag tagagacagg gttttgccat gtggactagg 10140
 ctggctctga actcctggcc acaggtgatc caccacctc agcctctcaa agtgctggaa 10200
 15 ttacaggcat gagccactgc acccagccat caataaattg gcttcttact gaataataaa 10260
 tccaaagtta acccacaag ttaaccactg ctgaatactt aagataaggt tagcccaata 10320
 atgaggctcc ttactccatc acaaagccca gattagccca ctggggagca tgctaggaaa 10380
 20 tccaggcctg accaaacaga gacaacctga cctcctaatt tgggccagga tggagaagga 10440
 acctctttgg ggagcagagt gagtttatcc agaaagagtg cctctactg tcttgggcag 10500
 25 aggaatgccc caccagtctg gcgatgccag gcttctcctg ggacttgtct gtttcacca 10560
 ccagctctgt gtctgtttga ggaagtgcc aagcagagggc agtggtccac ctgccagac 10620
 30 tcaggagccc ctcccagacc agcccctata gacaagaatg gagctaaagc taaacctag 10680
 agggatgccc catgcaggac ccaagtcaca ggcattggctt tctccagacg ccattcctga 10740
 35 ctccacaagg ggaagatcct cctcctctgt gccgggggtc ccaaagatcc tactctggcc 10800
 ccattccatag ttccctctga cctccctcac agagccatca aagaacctg gggcagggca 10860
 caggctgggg ggccaggaag gttcagatga ccagctgtgt ggctccgggc cagtcccttg 10920
 40 cctctctga gccttgtaaa gtggaaacag caaggcctgc ttccaggett gtgagaattc 10980
 aaggaggtga tttgcataaa accctgcaga tggcccccac cacataaaca ctcaaacaac 11040
 45 agctgtaatt gatggagaag gtagagcctc agaaacagag ggggtctcag aatgatctag 11100
 ccaagagttg ccaaataatc tcatatccaa aattttggcc atatttgtat attgtgtgca 11160
 50 ctgttgttta ttttaataca tattttaata tattttctat agataagcac acttaaaaat 11220
 ttaactccag catcactca agcaataaca tcaactactca aataaaataa tgttgaggta 11280
 gatgcagttt caacctgctt ttaggaatat gaatcctgtg tgattccaac cctgcagag 11340
 55 gtctgttat cacactttga agatgtggcc tctgatcgca ggagggggag tctgtgtctg 11400
 cccctcact attctgtcca catccatcac ccagccacg gtgcgagtc tgacatagct 11460
 60 ctgtccccgt cactccctga tggttttatc ttgaccacag cacagcaaaa agtgcaaaact 11520
 cctttgccca gattcaatat tctcatctc cagcttgacc aacatagcaa gacctgtct 11580
 65 ctaccaaaaa taaaaataga agtaaaaata agttagccgg gtgctgtgtg cctgtggtcc 11640

ES 2 279 916 T3

cagctattcg ggagactgag gaaggaggat cacttgagtg ccggagggtcc aggctgcagt 11700
 gagccatgat tgcactattg cactccagcc tgaatgaaag agtgagaccc tgtctttaa 11760
 5 aaaacaaaca gacaaacaaa aaactcctca tccctcctaa tttcttacct ctgcctacat 11820
 cacagagccc tagggatgtg gaggggggtac ctgctgcttc tgccctgccc gegtctcttc 11880
 10 ccaaagagct cctctatctg agctgcctct agtgggttgc ctgaggctga ctccacccca 11940
 tgctccacaa agtggggtcc tgaccagggc ttggccaatc aaaacacccc atctgtctga 12000
 15 ccacagtgat tgcactcagg atggatgtca acccaggcaa ggccagtga agcagtcctg 12060
 agatTTTTTT tctagaactc tagaaaactg acactTTTTT tggatctctc tcagagcttg 12120
 tagccatctt tgtcacctct tagagacagc ctccctgaaa atgacagcca tactgagaaa 12180
 20 tacaggctcag gagtcccat ggcatcatgg gaggtcctgg atccagccat atctgatgtc 12240
 caccctgtgg atttctcatt cccatgagcc aaaaaccacc tatgttgctt aatcatgttg 12300
 25 aattctatTT ctgtcacttg ccaccaaaga tccctgacac agtggagtgg agaaaagggc 12360
 tcagaatttg aagccagaag atcttgaagc aaatagtagc tcttctctgg ctcttttatt 12420
 30 ctctgaactc agttaccatc tctgaaatgg ggacaatagt gctcactgca cctggcagtg 12480
 aagaagaggc tgtgagaaag cagatgtggg agtgcttcat ggactgtgaa gtgctgtacc 12540
 agtgcacggg tttcctgcca ttactggctg actgccctga attactcacc gtctccccgg 12600
 35 cagcccaggc ttcgtcatgc atctttgctt ctgctggagc agactcctgc cctccaacac 12660
 ctttcccttc ccactctctc aactcaactt tcatgggtcca tgtgctgtat ccctgcagcc 12720
 40 acactggagt gttccagaac tctgcccact agcctattgc gtttgagggt ttactgggtg 12780
 ctactattaa ttatccactt actattgacc tttaacctgc ctctatTTT ttactccaat 12840
 45 aaacatgtct caaaaatatt atatcatgac catcagcaga taactggcat gaaataggca 12900
 gtgtgcgcca tgtggttcaa gacacagact atggagctgg ctggtctcag ttcaaatccc 12960
 50 agctctgcca cttataggct ttgtggcctt gggcagtttg cttaaccttt ctgggcctca 13020
 tctgtaaaat gggagtaatg ataatcacag cacctgcctc ataggctctt gggaatta 13080
 aattagtcaa cttttataaa gcatttagaa cagtgcctgg catatagcag atattatata 13140
 55 agtgttactt aaacaaaaca atcaacttac cataaaacta aatacaatac aacataaaaa 13200
 ctaaatacaa gaaaaacaaa ggcagtaatt gaatttttagt gacatgctac tgccctgctg 13260
 60 agagtccctag aaactggaga tgtgggttgt ctttgtttta agttaagaaa gggaggccgg 13320
 gcacactggg tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg ccgagggtgg aggatcattt 13380
 65 gaggtcagga gttcgagacc agcctggcca acacggcgaa accccatctc tactaaaaat 13440

ES 2 279 916 T3

acaaaaatta gccgggtgtg atgggtgtgtg cctataatcc cagctactca ggaggctgag 13500
 acaggagaat tgcttgaacc caggaagagg cggagggtgc agtgagcaga gattacacca 13560
 5 ctgtactcca gectgggcaa cagagcaaga cactctgtct caaaaaaaaa caaaacaaaa 13620
 cacaaaaaaaa gagagagtag tgtttaagat gcgatagcac caaattgaga atcttgcttc 13680
 10 ctccatcagc agggcaagtg atgaaagagc ctacgctttc actaggggat ccagggatat 13740
 ttaacactgt ttaaaataaa ctgctcactt ctgggaaaca tcagcttaaa aacacagact 13800
 15 ttctccatca ctccctcttc atgctccac agcaccaaat ggggectacc ctaattccac 13860
 tgccttctct gcccgaatc catccctttt tgggtctttg cagcgaggct gaccctgag 13920
 20 ggcaacagca ccttatectc agatacagat cgggccacca tgttgttttc ctacaaggac 13980
 agaagggtgc ttaggagget tcttgetaca ggagccctt gatatgggtt ggatatttgt 14040
 cccacccaaa tctcatgttg aaatgtcatc cccaatgttg gaggtggggc ctggtgggag 14100
 25 gtgattggat catgggggag gatttctcat gaatggctta gtgccatccg cttggtgatg 14160
 agtgagtcca cctgagatct aattgttcag aagtgcgtgg cgcctcccc ttttgcctca 14220
 30 gctgtcgtca tgtgatgtgt ctgcttctgc ttcacctca gccttgagta aaggetccct 14280
 gagggcctcc ttaccagaag ccgagaagat gctggcagta tgcttgta ca gctgcagaa 14340
 ccatgagcca attaaacctc ttttctttat aaattacca gtctcaggta ttgctttatg 14400
 35 gcaatgcaag aatggcctga cacaccgtg cagcacccaa cctctgcagt ctctacgga 14460
 ggagtgaagt gcacctgact tggagtgtgc caggteccag ctgtgcgtct ttgggcaagt 14520
 40 tctctaacc ctctgattct ctgttttctc atccataaaa tggaggctcat caatctttgc 14580
 tgcagggttg tcatgagcat taaaagtgtc atcgaaattg aagtcctgta ggtgcattta 14640
 45 tccaccagtt tcagtgtgta gaaatgtttc ctggagttgc tgtaattcac cctaaaagtt 14700
 gaccaaattt caagagattc tggggaaatg gagaagcttg gggcaggaaa ttagattgaa 14760
 50 gtgagtgtca tggagaatat aagggtgtta acttcatggt caacgtggtg gctcatgcct 14820
 gtaatcccaa tactttggga ggccgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag gagttcgaga 14880
 ccagcctggc caacatggtg aaacccatct ctactaaaaa tacaaaaatt agccagggtg 14940
 55 ggtggtgggc acctgtaatc ccagctactc tggaggctga ggcaggagaa ttgcttgaac 15000
 ccgggaggtg gaggttgagc tgagccgaga ttgcaccact gcactccagc ctgggtgaca 15060
 60 gagcgagact ccatctcaaa aaaaagaaaa agaagagaaa agaaatacaa agaaaaacca 15120
 caatgacata ccattttaat tttgtcggat tggcaaaaaac tgaaagtctg atgacatcac 15180
 65 atattgctca ggatatgata taataggaac tctcatttat agccagagga aatgtaaatt 15240

ES 2 279 916 T3

attacaactg gtctggtaaa aagtttggca tgaccttaata aaagcgaaca catgccctac 15300
 5 ctaaaaccca gtaacttcac tcttatgtaa actggtaaag aaattcttcc tgcattgtcta 15360
 tagcagcatt gattttaata gtgaaaaatt ggaaacaatc taaatagcca tcatcaggag 15420
 agtgaaaaaa taaatcgcaa tactgtcact cagtgtaaac atgaatcatt tacagccaca 15480
 10 cacaacaaag tgaatgactc tcacaaacaa aatttggagt gaaaaaagga agttagagaa 15540
 cagcataagc ataataacac cattgacacc aactgaaaa ccatacaaaa tcatcctata 15600
 15 tattgttttag gtaagcacac ccatacataa aatattttaa aattcatggg gataataaca 15660
 tcaaattttg aatagtgtgg aaaaggaggg ggtgtgagaa ggaggaatgt tcaagggctc 15720
 20 caacagtttg gtaaagcttg gtgaagctac catgggtgtt gatttatattt tatgcccttt 15780
 tgtatgttca aactatttca taccatttta aatgtaagtg aggetttagt ttgtaaaata 15840
 aaatatggat gagggacttc cacttctggc tataatgaag tagctgttgt cacactaatc 15900
 25 ctccactga gggcaactac taagcagaaa aaaaaaaaaac tgcacaagag agtgccaact 15960
 tatatagtac ttaagagagg aaaaatgcat tgaaattctg catgcaattt cccctcaaat 16020
 30 catgtgcaaa gtcattgaaa ataagtagca tgccaagaaa cttagcaaaa aaacacctgc 16080
 taataggttg gaaaactaag aaggaatttt cacagtttta caagctgagg gaagaattag 16140
 35 agttcagggc ctggcaaaaa aaagatgggc cctggtgagt acccagctat ttagaaaata 16200
 ctattccttg ggaataagga aaaattagaa atagttcatt cttgactgca tcaaggtgta 16260
 atctgcttat atgctatatg tctgctagaa gaaaatttaa attgatctag aaaaagttag 16320
 40 cttcatccaa agcctctata ctttttatac ataatgtcca actttcagtt aaaattacaa 16380
 ggtaaaccaa caagcagtat caaatgatca acaatgaaga taaaatagac aatagaaaag 16440
 45 ttacttaggt gaattggaaa atggcattat cagatatgat ttaaaataac tatgattaat 16500
 gtgttcaaaa attctatcag aaatttggaa cctattttaa aagtagaat cctggaactg 16560
 50 aaaaatataa taactgaagt ttataaggac tgaagagatg gatttggcaa catactagta 16620
 acatcagaag agaggattag taaactggaa gattgggtcaa tagaaaatac caagattgaa 16680
 55 gcatgcagag aaaaaagtt caaaaataca gaaaagagca aaagagacat agaagacatt 16740
 gtgaaatgat ctaacataca tgcatttgca attaagaagc agaagagaga gaaaacaagt 16800
 aagaagaaat agcagtgate ttaaaatttt ttccaaact aacaaaagac attaaagccac 16860
 60 agattttaat agctctacaa accacaaata ggataaatatc aaagaaaacc acatctagge 16920
 atatcataga aaaactattt taaaaataa aagacaaaga tatgcagtat gcagaaaaaa 16980
 65 aagacacttc accttcaagg aagaaacaat aagactggca ggggactttt taacaaaatg 17040

ES 2 279 916 T3

atggaagaca gcagacaatg gaacaacttc tttcaatgct gaaatttcaa aagccaattt 17100
 5 agaatttttat atccagaaaa aaatctctta aaaaataaaa gtaagggtcaa tatgatacag 17160
 acagctataa aaatattaca gttaacatca tacttaatgg taaagaaatg aaagctttgc 17220
 10 tectaagatc atgaacaaga caagtatgtt cactcttgtg actttttataa aacattttac 17280
 tagagggttct agccgaggca attaggtaag gaaaagaaat aaaagacttt cagattggaa 17340
 aggaagaagt aaaccatttc tctttgcaga taatatgac ttgtatatac aaaactaaag 17400
 15 gaattttacac ctaaaacgaa caaaaaccaa ttagagctaa taaacaaatt tagcctagtt 17460
 gtagaatata agattaatag acacaaataa tgatatttta tacacactgg caataaataa 17520
 20 tctgaagatg aaattaagaa agtgatttca tttacaataa tacaaaacag aacaaaatgg 17580
 ttaaagtaaa ttttaacaaaa ttcattagtt atgttaatat gagatgaatt tgtttattag 17640
 25 tgtgagactt gtgcaataaa acctacaaat gttattgaaa taaattatag aaaacctaaa 17700
 taaatggagg atataccatg ttcataagatt ggaaaactta atgttatcaa gatgacgcct 17760
 caaattgatc tacagattca aagtaatctc tataaaaaat cccagctggc tctttttttt 17820
 30 tttttttttt ttttttgcag aaattgacaa actagtccta aaatttatag ggaaatgtaa 17880
 gggactagaa tagccaaaaa ggttttgaga aagaacacag ttggaggagt caaacttctt 17940
 35 tatttcaaag cttactacaa agctacactt atcaacactg tggtagtgac acatagatgt 18000
 acatatagat caatgggatt gaactgagag ttcagaaaga agtgcatata tttatgttta 18060
 40 accgattctt gatgaggggt ccaaaacaat tcaatggggg aaagaatagt ctttaaaaca 18120
 aatggtacca caaaaatgga tatccacaat gcaatataat gaagctagat ttctacttca 18180
 caccgtatac aaaaattttac tcaaaataga ttaaagacta gatgtaaaaa gtaaaactat 18240
 45 taaactctta gaataaacct aggtgtaaat cttcatgacc ttgtatgaga caataatagt 18300
 tttttaaata tgacacaaaa gcataagtaa acaaagaaaa aatagatcta ttaaactgta 18360
 50 tcaaaattta aaatgtttgt gcttcaaaaa atactatcaa gaaagtaaaa ctataacata 18420
 cagcatggga aaaaaagcat ttgcaaatca cgtatttgtt aaaggctctg tattttagaat 18480
 55 atgcaaagaa ttcttgcaac tcaagatcta aaaggcaaga attaaaattt aaaatgggca 18540
 aaagatttgg atagacattt ctccaaagaa gatatccaaa caacaaacac atgaaaaggt 18600
 60 ggccattgac attactctct agagagatgc aaatcaagaa cataatgaga taccacttca 18660
 catgcattag gatggtaata ataataatca atcacaagtg tgaatgaggg ggcggagggg 18720
 gagaatgtaa aatgggtgcag ccactgtgga aaacagtttt gcagttcttc aaaatgttaa 18780
 65 atacagtcac gtgctgcata atgatatttc attcaatgac agactgcatg tacataggcg 18840

ES 2 279 916 T3

	ggcccatagg actataatga aggtgaataa ttcctattgt ctagtgacgt catgacacaa	18900
5	cactttactc atgggcttgt gatgatgctg gtggaaacaa atttactgca ctgccagtca	18960
	tataaaagta tagcatatgc agggctaggt gcggtggctc acgcctgtaa tcccagcact	19020
	ttgggaggcc aaggcaggca gatcatttga ggtcaggact tcaagaccag tgtgacaaac	19080
10	atggtgaaac cccgtttcaa ctaaaaacac aaaaaactta gccaggcgtg gtgacacatg	19140
	cctgtagtcc cagctactca ggaggccgag gcaggagaat cacttgaatg gggaggcaga	19200
15	ggtagcagtg agccgagatt gcgccactgc actccagcct ggacaacaga gtgagactcc	19260
	gtctcaaaaa aaaaaaaaaa agatagcata tacaattatg tattgtacat aatgcttgat	19320
20	aataataata ataataataa taaactatgt tactgggtgta tgtatttact atactatata	19380
	ttaaatcact atttttaggt gtgctccttg tacttactta aaaaaaatg ttggaggggc	19440
25	acagtggctt acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggct gaggcaggca gatcacttga	19500
	ggtcaggagt tggaaaccag cctggccaac atggtgaaac cccatctcta ctaaaaatac	19560
	aaaaattagc caggcacggt ggtgtgtgct tgtaattcca gctattcgtg agactgaggc	19620
30	acaagaatcg catgaaccca ggagggtggag gctgcagtga gccaagattg tgccactgca	19680
	ctccagcctg ggtgacagag caagactctt aaaaacaaac aaaaaatgtt aacttgtaaa	19740
35	acagcctcag gcaggctcct caggatggat tccggaagaa ggcattcatta tcataggaga	19800
	tgccagctcc atgtgtgttt ttgccactga agaccttcca gtgggacaaa atgtggaggt	19860
40	ggaagacagt catattgggt atcttgacce tgtgtaggcc taggctaata tgtctgcctg	19920
	tgtcttagat tttttgtttt ttgttttctg ggtttttttg agatggagtt ttgctcttgt	19980
	tgccataggct ggagtgaat ggcgtgggtg tggttttccc gggttcaagt gattctcctg	20040
45	tctcagcctc ccaagtagct gggattacag gcgcccgcca ccatgcttgg ccaattttgt	20100
	atttttagta gagatggggc tttcaccatg ttggccaggc tgggtctgaa ttcttgattg	20160
50	caggcgatcc gccctccttg gcctcccaa gtgctgggat tacgggcatg agccaccatg	20220
	ccccgcgtgt cttaggtttt aacaaaaaaa atttttttaa gtaaaaaaat aaaaaataaa	20280
55	aaatttttaa atataatata taaaaaggct tttagaataa gaatataaag aaaaatattt	20340
	tgtatagctg tacaatgtgt ttgtgtctta agtggttagta caagagtga cgaaaacact	20400
	taagtgttat tacaataaga taactgttat taaaaagtgt ttattcaaaa agtttttaaaa	20460
60	agttaaaaatg tttataaaga aaaaatgttg gcggggcgca gcggctcatg cctgtaatcc	20520
	cagcactttg ggaggccaag gcgggcagat cagcagggtca ggtgatcaag actatcctgg	20580
65	ctaacatggt gaaacccgt ctctactaaa aataccaaaa aaattagccg agcgtggtgg	20640

ES 2 279 916 T3

cgcgcacctg tagtcccagc tactctggag gctgagacag gagaattgcc tgaacctggg 20700
 agggcggaggt tgcagtgagc tgagatcgcg aactgcact ccagcctggg tgatagagtg 20760
 5 agactctgtc tcaaaaaatg aaataaaata gggccgggcg cggtagctta cgcctgtaat 20820
 cccagcgctt tggaaggggcg agacgggcag atcacaaggt caggagatcg agaccatcct 20880
 10 ggtagcacg tgaaccccca tctctactaa aaatacaaaa aattagccgg gcgcagtggc 20940
 agggcgctgt agtcccagct acttgggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaaccgggga 21000
 15 gggcgagctt gcagtgagcc gagatcacgc cactgcactc cagcctgggc gatagagcga 21060
 acctcgtct taaataaaat aaaataacat aaataaaata aaataaaata aaataaaata 21120
 aaataaaata aataggaaaa atgttacagt aagccaaagt taatttatta ttttaaaaat 21180
 20 tcaataaaat ttagagtagc ctaagagttc agtgttgata aagtttacag gagtgtacag 21240
 caatgtcctg ggccttcaca ttccctcagc acttaatcac tgacaccag agcaacttcg 21300
 25 aatcctgcaa actgcattca tggtaagtgc cctacacagg tgtgocgttt tttcatattt 21360
 tatattatgt tttcactgta ctttttctat gtttagatac acaaatactt acaattgtgt 21420
 30 tacagttgcc tacagtattc agtaccgtat catgctgtgc aggtttgtag ccaattagca 21480
 ataggctgta agatacagcc taggtgtgta gtaggctata ccacctaggt ttgtgtaagt 21540
 35 gcactctatg acgttcacac aatgacaaaa ttacctaatg acacatttct cagaatgtat 21600
 cctcgtcatt aagcaatgta tgactgtttc catatgacca agaaatttca cacctagtta 21660
 tatagtgaag agaattgacc agatgcagta gctcatgcct gtaatcccag catactggga 21720
 40 ggccaaggcg ggagggttgc ttgagcccag gagtttgaga ctagcctggg taacatggca 21780
 agacctcatc tctacaaaaa ttaaaatgaa aacattttct gggcatgggt gtatgtacct 21840
 45 gtggccccag ctactcagga ggctaagggt ggaggatcac atgagcccaa gagtttgagg 21900
 ctacagttag ctgttttcac accattgcag tccagcctgg gtgacagagt gtgacctgt 21960
 50 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaagaaa aaagaaagaa aaaggaaaga aaacaattgc 22020
 ggatatatgt ccagaaagaa atgtacaaac cattgtagac aaatattcac agcaacatta 22080
 ttcataatac caaaaaactg gaaacaagca aaatttctat cgactggtga atggataaag 22140
 55 aaatgtagta tatccatgca gtagaatgtt atttagccat ataaggaat gaactactga 22200
 tacctgctac aaaatggatg aactttaaaa attcatgcta aagtaaagac accagacaca 22260
 60 aaaggcctca tattgtatga ctccatattg atgaaatgtc cagcattggc agatccatag 22320
 agacagaaag taggttagtg gttgccagga gctgaggctg aggggagggg ggatagagag 22380
 65 taacagcaat ggatgtaggt ttgtttttgg agttagtgaag atatagagtt agtggtagtg 22440

ES 2 279 916 T3

actgcacaac tttgttgaat tgcacatcct aagagtacat tttcagtttt gtgaattaca 22500
 5 tctgaaatac agattttttga aaatgaaggc aaaataagga ttttttttca gacaaaaata 22560
 agtaagagat tttgtcactg atagacctgc atcaagagat atacaacagt gagtttttca 22620
 10 ggtaaaagaa aaataattcc agatgggaag caagttactg tagggtgaaa tgaagagcaa 22680
 cagaaagtac tctaaatata tgaattaggc tgggtgcggt gggtcacgcc tgtaatccca 22740
 gcactctggg aggcctaggc ggggtggatga cctgagggtca ggagttcgag atcagcctgg 22800
 15 acaacatggc aagacctagt ctctactaaa aacacaaaaa attagccagg tgtggtggcg 22860
 caaacctgta gtgtaggcta ctaggaggc agaggcagga gaatcgcttg aatccggaag 22920
 20 gtggagcttg cagtgaactg caactccagc ctgggtgaga aagtgaact ccagcctggg 22980
 tgagaaagtg agactctgta tcaaaataaa taaataaata agtgaattac tatgattttt 23040
 25 aatttcttaa cataactaatg atgtaaacta tatgcagaat taaaatacac gaccatgaaa 23100
 ccccaaaggt aagaagaggt gaataaagtt aaagaggact ttgtacaaga ggacttcaaa 23160
 ttgtacaaga ggacttcaaa aagctcatgg aaacatggaa ttaaagataa caattaaaaa 23220
 30 ataaactcta tttctcaaca taaattcagt caaggtcaag gcacttttgt aagtgatgat 23280
 accaggcaca tagtccatct ccaaagaact ggggggtcct gggaatatag ccatgtcaat 23340
 35 gcaggctttt ttacattatt aactaaagaa aaatgggtga tcgttaaaga ttgcttaaga 23400
 ttaggagaca aaaagaagtc agaaggagcc aaacaggact ttaagggtga tgcctaattt 23460
 40 ctcatggaag ctgtaaaatt gcccttattt gatgagaaga atgagcagga gcattgctat 23520
 ggtggaggac tctctgggtga agctttcctg cgcgtttttc tgctaaagct ttggctaatt 23580
 45 tccccaaaac actctcatga taagcagatg ttatcattct ttggctgtcc agaaagtcaa 23640
 caagcaaaat gccttgagca tccccaaaac ctggtgccat gacctttgct tttcttgacc 23700
 ggtctgcttt tgtcttgact gaacctcgtc tacctctttg gagccactgc tttgtcttca 23760
 50 ggatgaactg gtaaagccac gtttaattct ctgttacaat tatgtgagga aatgcttctg 23820
 aatcttgatc ctattagttt aaaatttgca tgggaagttc tgctgttgtc tgcagctgat 23880
 55 ctgggcacag tgggttgga cccagtaagt ggggaagttg cccaacttta attttttggg 23940
 cagaattgtg taacctgaac taattgagat gtctatgggt ttggctattg tttgggctgt 24000
 60 taatagttgg tcctcttcaa ttagggcatg aacaagatga attttttcct aacaaattga 24060
 tatggatgat cggccacgga gggctttatc tttatcattg atttcgccat ccttccaccc 24120
 tagttgcacc ataaatttga tgtttgttcc tgcttcaatt ttagcagaat tcatgttgca 24180
 65 atgatagggg ctttttttga aacagacgcc ttatccttct tagtgcctca aactagatcc 24240

ES 2 279 916 T3

	tgttcagaca	tgttatagca	agttagtaca	agttttat	ggcgcagaaa	aaagtttgaa	24300
5	ctttatgcat	agttttttca	taatttgaat	tttccatgaa	cttttggaag	aattcatatt	24360
	aggtagatcc	taataataat	aagtatgcat	gttgtaatct	ctaagataag	cacaaaaaga	24420
	atataaaaaga	aagtacaatg	aacaaaactaa	taggaaaaat	ggaataataa	tttttaaaac	24480
10	ttgattttct	aaaaactaga	acaaagaagg	aagaatagat	aggtcaaaaa	agaaaacaaa	24540
	tagcaagatg	gtagacataa	tcccagacac	atcagtgcct	tcattgatgt	ctgaaataaa	24600
15	aggcagtctt	aataccaaaa	cttgacatta	aaggaaagta	gaattacagg	tcaatctttc	24660
	ccataaataa	tctaaaaaat	atctgaaaca	aaatattaac	aagtcaaata	taataatatt	24720
20	tataaaaaata	gataacatat	tattatcaca	ttgggtttatt	tcaggaatgt	aagggttagta	24780
	tgacatttag	aaaccataat	caatttcacc	acatttaactc	aataaacaag	aaaatttata	24840
25	ttatcattta	ataagttcag	aaagcacatt	taataaattg	caacacccat	tcattgatatt	24900
	taaaacctgt	caggaaagca	gaaatagagg	agtcttcttt	aatctaatta	cgatcacaca	24960
	cacacacaca	cacacacaca	cacacacaca	cactatacat	agctaacatt	atccttaatt	25020
30	gtgaaatatt	gaacacttcc	ttactgaggt	caggggcaaaa	acaaaaacat	cttatactag	25080
	aggtgctaata	taacataata	aggcaatgat	aagaaacttt	taatttataa	agattagaaa	25140
35	actatgtgtt	taagttatat	aagaattgag	gaaccagaaa	agtcacgat	actcaacaaa	25200
	taaactatta	gaataataat	tgttattatt	attcaaagaa	gctgaagatg	agatcaatat	25260
40	aaaaatctat	tgtgtttcta	acaatcagca	aaattgacaa	accttagtt	aaactaagaa	25320
	aaaaagagag	aagactcaaa	ttaactaaaa	tcagaaatga	aagaggagac	attgtaacta	25380
45	tgtcacagag	ataaaaagga	ttctaagaga	ctactatgaa	caatttatgt	ccaacgaatt	25440
	ggatacttca	aataaattag	taaattccta	gacatatata	acctacccat	actgatcatg	25500
	acaaaataga	aatcttaagc	agacctaaac	tagaaaggag	attgaatcag	taatcgaaaa	25560
50	cctcctagaa	aaaaaaaaaa	aaaggccaag	accaaattggc	ttcactagag	aatgctacca	25620
	aatacttaaa	gaatcaacac	caattcatcc	ctaacacttc	caaaaattga	acagtaggga	25680
55	acacttccaa	actcatttta	tgatgcccc	gtaccaaagc	cagacaaaga	tgcaayaaaa	25740
	caaaaccata	gaccagtact	cttgatgaat	actgatgcaa	aaatcctcaa	caaaatgcta	25800
60	gcaaaccaaa	tttaacaaca	cattaaaagg	ctatacacca	tgaccaagta	ggatttatct	25860
	gcagaattca	aggatagtta	caaaaatcag	ataaatgtaa	tacatgaaat	taacacaaaag	25920
	aaggacaaaa	atcacatggt	catctcacct	gatgcagaaa	aagtatttga	aaaaattcaa	25980
65	tactctttca	tgataaagaa	aacattcaag	gaactagaaa	tagaaataaa	ttacctcaac	26040

ES 2 279 916 T3

ataacaaagt ttatatataa aaagcccaca gtgaatatat tcaacagtaa aaaactgaaa 26100
 ccttttccctc taagatcagg aacaaggcat ggatgccac acttgccatt tctattcaac 26160
 5 tggaagttct agccagagca attaggtaag aaaaagaaat aaaaggatc taaattggaa 26220
 aggaagaaat gcaattatct ctgttcacag attacgtgat tttatatgta ggaaacccta 26280
 10 aatattaaaa aaatgggttag aactaatcag tgaattaagc aaagttgcag gatacaaagt 26340
 caacactcaa aactcagttg ctttttttac attaacaatg gacaatccaa aaagaaactt 26400
 15 aagcaaaaaa tttcatttac aatagcatca aaaagagaaa agtacttagg aataaaactta 26460
 gccaaggagg agaaagactt gtataaaaca tttttgaagg aaattaaaga acacagataa 26520
 20 gtgaaaagac atcccatgat catggattgg aagacttaat attgttaaga tgacaatact 26580
 actcacagaa aactgaattt aatataagcc ctatcaaaat ctcaatgaca gtttttgcag 26640
 aaataaaaaa agaattcatc ctaaaattca tatggaaactt caagggaccc taaatagcca 26700
 25 aaataatctt gagaagaag aacactctaa aaaaaaaaaa aagaagaaga aggagaagga 26760
 gaaggagaag gagaagaaag ctggaggcct cacatttcct gatttcaaaa tgtattaaaa 26820
 30 agctacagta atcaatatag tatgggtactg gcatacagat agatatacag accaatggaa 26880
 aagaatagag agcccagaaa taaacccttg tgtatatagt caaatgatct acaaaggcac 26940
 35 taagtctata caagagggaa aaggaagttt gttcaaggag atagtgtgtg aagaacccaa 27000
 tatccatatg caaaagaatg atgttggtac cttattttac tccatatgca aacattaact 27060
 caaaatgggt taaagaccca aacataagac ctgaaactat aaaactccta gaagaaaaca 27120
 40 tatgggaaaa tcttcgtgaa attggaatgg gcaatgattt cttgtgtgtg ataacaaaag 27180
 cacaggcaac aaaagtaaaa atagacatat gagactacat caaactttta aacttctgtt 27240
 45 cagcagagga aataatcaac ggaatcaaaa ggcaacctat ggaatgggac aaaatatattg 27300
 caaaccatac aagagatatg gggttaatat ctagaatata caaagaactc ctacaactca 27360
 50 ataacaacac aaaaacaaat aactcaattt aaaaatggcc ggggtgtgtg gctcacacct 27420
 gtaatcccag ctttttggga ggccgaggcg ggccaatcac ctgaggtcag gagttcaaga 27480
 55 ccagcctggc caagatggcg aaatcccatc tctactaaca aatacaaaaa ttagccaggc 27540
 atgggtggcag gcacctgtaa ttccagttac tcaggaggct gaggcaggag aattgcttga 27600
 acctgggagg cggagggttc agtgagccaa gatcacacca ctgcactcca gcctgggcaa 27660
 60 cagagcaaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaggacaa aggacatgaa 27720
 tagacatttc cccaaagaag atcagcaaat gcccatthaag catacgaaaa gatgctcaat 27780
 65 atcactaatc atcagggaaa tacaaattaa aactacaatg agatatcatc ttgcacttgt 27840

ES 2 279 916 T3

taggatgggtt attataaaaa aaaagaaaaag aacaaatgggt ggtgaagatg tagagaattg 27900
 5 aaacccttgt gcacttttag tgggattgta aaatgatgag aaacttttaa aaattttttt 27960
 aattaaaaaa atagaaatac cagacatata tccaaaagaa ataaaaacag catctcaaag 28020
 10 agatatttgc acacctgttt ctgcagcatt atttacaata gctaagatga gcaagtaacc 28080
 taaattttatt gataggtgaa tggataaaga aaatgtagta catacataat ggaatattat 28140
 tcagacttta aaaaggagga agtcctgtca tatgttacga catggatgct tcttgaggac 28200
 15 attctgcaaa gtgaaataaa ccaattgcaa aaaaacaaat actgcattgt atcacttata 28260
 tgatgtatgt aaagtaatca atctcataga aacagaaagt ggaatgctga ttgccaggga 28320
 20 ctgggggagg gagaaatgaa aagttgtttt tcaatgggta tagagtttca cccatgcaat 28380
 aggaaaaagt tctagagatc tcttgtaaac caatgtgcat acagtttaca atattgtact 28440
 25 gcacatctaa aaattgttaa gggtaaaaaa gatctactgg ttaataaaat ccaaaccggg 28500
 gacactatac ttgcaactac aataccctct cttgttagat tagcaaagga aaggatccat 28560
 aaacattaca aaagcaaaga aaggcaggaa gccctcaact gggtgtcagt tgaagtgggc 28620
 30 tgggtttgat agctatttct ttaacatct ggaactttag ctttaaaaag tgttaataaa 28680
 gttgtaaagt ataaaaactc attatatttc tgtacactac aaacagtcaa gaaattttaa 28740
 35 aattatgcca ttacatcag catcaaaaaa tcaaatatcc gagaagaaat ctaatgaaag 28800
 atgtacaaga cttttttttt ttttttgaga tggagtcttg ctctgtcact cagctctgtc 28860
 actagaggca cagtctctgc tcaactgcaac ctccgcctcc tgggttcaag caattctgcc 28920
 40 tcagcctcct gagtagctgg gattacaagc atgcaccacc acactcagct aatttttgta 28980
 ttttttagtg agacagggtt tcaccacatt ggccaggctg gtctcgaact cctgacctca 29040
 45 aaagatecac ccaccttggc ctcccaaagt gctgggatta caggtgtcag ccactgcacc 29100
 tagttgatgt acaagacttc tacacagaaa cctacaagac attactaaga aaaattagag 29160
 50 aaaacataaa taagtgggtg tacatactat gttcatggat tggaaaattt aatactttaa 29220
 ggatgctagt ccccccaaa ttgaagtaaa gtttcagtaa aatccaaagt ttcaagaaaa 29280
 55 aaatctccag caagattttc tttgggtgaa attgacaaga tagttctaaa atttatatag 29340
 aaatacaaag gactgaaaat agtttagaca attttgaaga agaatgtcaa gatttataaa 29400
 gtaattttaga aagtatggca ttgttgcaag gaaaaacaaa ctaaccaatg gaaaagaaca 29460
 60 gaaacagtag aaataaactc atgtattcaa ccacttgatt ttcagtaagt caccagtgca 29520
 aggcagtgga gagaaaacat gatgttttct taaatgatgg tatattaatt gaatattcat 29580
 65 atggaaaaag taaaccttga cccctacctt acaccatata gaaaaataaa ctacagatag 29640

ES 2 279 916 T3

actgtagacc taaatgtgaa aggtaaaaca gttaatcgtc tagaagaaaa cacagaataa 29700
 5 tttttttatc actttattgc aggcaacact tcttaaacag cacatagaaa gttctgggtca 29760
 taaagaaaga tttataaata aacttcatga aaattaagat tttttattga tcaaaagttt 29820
 ccattaagag aatggaaaag aaactgaaag aggaagaggg aaagaattat atatatgtaa 29880
 10 atttataata aaatataaat ataaaaatat ttattttataa atattatata tattttataaa 29940
 atataaatta tatataataa acatatataa tttatttttta taaatatata tatggagaga 30000
 15 gagagaaata aacacaattc caagtgtctga aaaggatata gagtaactaa actctctgtc 30060
 tctactcaat attctggtaa gagtgtaaat cgacacaacc actttggaaa acttctgtctg 30120
 20 agcagagact caacatttcc acttccaagt tatataacca aagagaaatg caagcatatg 30180
 tgcccaagca gacatgtacc agcatgttca tagcagccat tatttacaac ctccccacac 30240
 25 tggaaagaac ccaagttctt ggtttccctg tatctttttt ctgtcacacg attgaggaat 30300
 gggatgcgtc tagttcctca agtcggccat tctctgcaat gtgaccagg tagggacatg 30360
 gggctgaaag tgaaagggtg gtagtgtggt aaaagtaaaa tggccctatt tcttataggg 30420
 30 atcacaaga aatgaggtgg gcaagaggg actccccaga agtgccagga acaggagcca 30480
 acaggtcacc agaagaggaa gtgttaaggc ggagggactt cccgagaggg aacacagaag 30540
 35 aaagaactcc taaagttatc cagggctctc aaggacttct gccacctgc tctctgtctg 30600
 gtctctctct ctgaccttcc tgctatagct acagagctgt ggttctctca actccattct 30660
 tactccaacc gtgtcattcc atggctctct gttatccaca aaagaaaaac cccaaattcc 30720
 40 ttgtctggta ttcaaggcat ttctggatct agccccagt attcatactg gacttcaggc 30780
 tcatcagacc actgacagcc tcaccaacat gctccattca cctggcttgc acacctgtgc 30840
 45 atgtgtgttt ttagccacgg aaactatctg ccttttttga ctgactgtta gcctctact 30900
 cagtcttcaa aatcccatc aaatggcagc tctctgtca atctttgacc tctccaaaga 30960
 50 gcatgagtea ctcttctctc tggggctccac cctccacata gtacatagct catggtgttt 31020
 tcatctatat tctgggcacc atctaggcag ggacagtggt tttctttgtt actgctgaat 31080
 55 cccagtaac taaccagtgc ctacagtggg tgctcaaaac atttgctaca tgagtgacta 31140
 aatgaaagag aatgctttct atggaaacga attgtgaaca aacattatcc tcaatgttaa 31200
 60 gacctatgta gaccgtacac tccaaagtta aatcttacc tttttgacc atttttctgg 31260
 agcttagggg attgagagcc ttatgtattt ggtgaggata cgttttttgt tgtgttttgt 31320
 tttgttttgt ttttgagatg gagtottgct ctgttgccca tgctggagtg cagtggcacg 31380
 65 atcttggctc actgcaacct ccgcctccg ggttcaagtg agtctctctc ctacgctcc 31440

ES 2 279 916 T3

caagtagctg ggattacagg catgggctac caagcttggc taactttgta ttttagtag 31500
 5 agacaggggtt tcaccatggt ggtcaggctg atctcaaact cctgacctca ggtgatccac 31560
 cctccttggc ctcccaaat actgggatta caggcatgag ccaccgcacc tggccgagga 31620
 10 taaaagcttt aatgcttcaa tcttttttct ctgcatcagg gcctttggac atgcctttcc 31680
 ctctgcctag aatgcttttc cccagcttc tttcctttct catctcagg tttcaagttc 31740
 agtgttgcc ttccaaagag gcaacctat ctgaactggg tctacgccac agatctctgt 31800
 15 agccacatc cctagtttg tctccttcat agcagggtga agatgaggaa tegttttgta 31860
 aatgtctctg tgtatgtgt tgaacttgt tctgtactg aagcatgagc tctcagaggc 31920
 20 tgggtaattg acctattttg ttcagcacag tatccctagt gcagagaagg ggacctgtag 31980
 gtgccccata agtagctgaa gaagaatgtt aagtgaatga atgaatgagg ctaaaaatgg 32040
 25 agacagcccc taagagggtc tgctttctc attagcttcc tcactgtccc cagaaactcc 32100
 cccagaccc acctcaggca acatcttctg ctccagagt gtgaataatc atgactaatg 32160
 tcatcagatt agtaacaagg aactttcaga gaaggacagt gggctgcccc gggtcacaca 32220
 30 gcaagtctc atctcagtgg gttctcaggc tggggaagaa ctagcccagt ggcctgggt 32280
 cagaaagcag actctgcat tcactcacag tgggaacttg gccgtatctc tgctttctc 32340
 35 tgagcctcag ctttctcat ctgtggaatg ggggcagcag gcttagcctg gatgcggagt 32400
 gtgaggcagg ttagtgtgt tagtattagg tgtgtggtta gtgttagttg ctttctcatc 32460
 40 ttttttttct cgccagtggc aaggggtggg ttatgggtgt ctgaaggcag gtatgttggg 32520
 gacctcaggc ttacagttaa tcagtagaag acgaagggtga gaggaagggc cttctcctcc 32580
 ccagctcgtg caacctctga ggctgtgcga cctctcagcc tatctctctc tccagccag 32640
 45 gcagcaaate tctattagct ccagcaatct tccctcctg gcacttctc cagcctgtgc 32700
 aacctctct agctgtggag catgagggtc cagtcgcagc acccgaccc cccactcccc 32760
 50 accccgctg cctgtgcaat ctctatctcc ctgcaagccc tgccatctc tgcagccttg 32820
 cccaaacctt gcaacctctc agcctctgca gccagatctc actccagctc catttctctc 32880
 55 agcccaggag gggccgcttg tagagcagt aaaggaggct ttgaactatg ccacgagatg 32940
 gagcggagct ggccaccac cgtctctctc cctcagttc ccagcagccc ccatcagccc 33000
 60 gccctggccc tggccaaagt ggactggtgt tactgattca ttctggggaa agttggcaag 33060
 cctcgtctc agtcaagccc gcttggcaga tggggaaagg aggccagag aggccaggg 33120
 ccttgctctg ttcacacagt gggggatggc aggggcctgg gctaggaccc gggctggtgc 33180
 65 acttgcccc actccccggg gacaattcag ggcaggggtc ggggtggcca gatccttctc 33240

ES 2 279 916 T3

gtgggctgca gagatcagca ggctgggttc ctgatgcaga tgcctgggc agtcgggggc 33300
 cctccttggtg gcccctgccc cccagcctgg ggaatattct caggtcgttt cagaagtcc 33360
 5 aagtttactc agaggtctca tttgagctgt catgaaaagt ccctttggcc tggggccagg 33420
 gcagggagtg ggggcggttg cacctgtgag ccaggggttg gggtggttc ctcccattgc 33480
 10 cccctctccc tccccttcac gtgtccgggg gctccggagg gcaggggaagg agggcatgtg 33540
 aggaaggggc tgcgagggca agaagacctt ctctctggag gaagcatctg tccccctctt 33600
 15 ttcactgtct ctttctagac ggttccctga gtgacctag aaaaaccccc accctgtctt 33660
 gaacttcagt tccccatct gtaaaagggg ggaagcagaa tcatcataag agctcttatt 33720
 tactgaggtc tcatatatgc caatatgacc aataatattt attatttttt ttctgtattt 33780
 20 tcatagctaa aagcaaagag ctcttacata tttaaagtaa aacataggcc ggccacggtg 33840
 gctcatgtct ataatcccag cactttggga gactgagaca ggcagatcac ttgagcccag 33900
 25 gagttcaaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccgcc tccactaaaa atacaaaaat 33960
 tagccaggtg tgggtggcagg tgctgtagt cccagctact cgggagggtg aggcaggaga 34020
 30 atcgcttgaa cctgggagat gaaggttgca gtgagttgag attgcgccac cgcactccag 34080
 cctgggcaac agagcaagac tctgtctcaa aaaaaatta aaaaaaaaaa aaagtaaac 34140
 atgatagcgg gcacttctca tgagccatct gtgccagct cttttgcctt ccccatcaca 34200
 35 ctggctctct ctgtgtacct cagagcttca ggacctaggg aggtgcctgg gccatggtag 34260
 atgttccata aagaataggt tgagtaaate ctaccacag acctagaca ggcattctta 34320
 40 ttcctatttc cactcttaca gatgcagcaa ctgagctgca gaaagggttag gtggcttctt 34380
 caaggtcaca caggtactaa gcggtggact tgaacccagg tctggccagt tccacagctc 34440
 45 aaagtcacaa ggggtggtgt gctgggaagc cagttccagt tccccatct aaccgcaggc 34500
 accccttctt agttgtgtgg agaaggcccc tgtgcctgcc tgtgaggatg ctgaaggcgc 34560
 tagcttccct ctctggctgt ggaaggaacg gataccccgt tcttttcatt cttttattta 34620
 50 tcaggeacct gggttgtcct gatgctacaa agaggtgggt tctcccaga acttctggtg 34680
 gctggcttct tcttgaatgg gctctctct ctggtatcca cccctactc tactgccac 34740
 55 aagcccttta ctggctctaa tcccacctc ccagtttctt ctctagcct gaaaccagga 34800
 acgctgggca gtgggagcct gcagtctgag ctgagagctg tctttgcctt gctctcccca 34860
 60 cctctctctg tcttggttgc tgctctctcc tatcacaagg gcttttagct acctccactg 34920
 tgggactgag taaggatccg gacacctcc tggcagagga gcgggcagga caggggcac 34980
 65 gctgagccca cgggtggggag caggtgagca gggcctctcc tctgggggtt gcctgtcttc 35040

ES 2 279 916 T3

gtgggaatga atactccgcc atccccatcc aatgctgctt cccagaagct acccaagccc 35100
 atgagtcttg ttttcatgtt attctatcta gcagggtggtg gccttgctct acagactggc 35160
 5 atccaatccc agctccatgt catctggtca cagttaacct ggggcaaggt tgtccccact 35220
 aagcctcact cttgtcatct gtgaaatggg ctgaatgagg ctgcccgctt cacctgttga 35280
 10 ggactatggg agacgcttaa gtgcctacaa catggtgagt tggcactggg ggggccagag 35340
 ccagggtggc ggccaggcag gaccacagca gcctgagtggt gtcgctcccc ctctgtcact 35400
 15 cttggagtcg ggcccgctct catgggctca aagcttctca tgcacaaac tctcttctct 35460
 aaaggaaaag ggccattagg agcacagctt tcacctgtt cggccctgag gtccccacaa 35520
 ctagctccac caggatgggg gtacctgggt cccatttca tagatgagaa aacctgggt 35580
 20 tctcaaggct agaagcagag agacttgccc aagttcaccg agtgaggaag gcgctgggc 35640
 gggttttgac ctggcaggtt tccccgact ccacctgtg cttctgaaag cccactctc 35700
 25 ccccagggg atcacagatg tctctctgc agcagcctcc tggctttgaa tgtcccgac 35760
 ctggtcttct gccttactg agcagagacg tcattctctg ggcaagtcct aagttccgc 35820
 30 tcccagggc tctccacca ggaatgttct tcttttcca tcttcaagg ctccagctcc 35880
 actgaacctc ccacctctc ctctccaca tgcacagggg actgggttg cctcttacca 35940
 tccgacctgt tccccgtgct tcatgagaaa gatgcagcga cagctcatgg ggtcacctgg 36000
 35 cttgactgcc cgacctgcta cgtccagtt gagtcaccga gggaaaatca ctctacctct 36060
 cgcagctca ttgcctcatc tgcgaaatgg gcacaccagc cattgttttg aatgactggg 36120
 40 tggaatcaag gtggtaaagc atagaaactg acacagaatg ggtcccatca ggctctacac 36180
 ccatgcccgt cacctccga ctccgccc cagaatcggg tgattgacat gttatgtttg 36240
 45 gcttgaaact ggcttctct cccagccc ctacattttg gaggtggtt tcaagatag 36300
 agggctgtct cagccacatc cctgctgctg ggcccttaag ctgtgctgaa caagagacct 36360
 50 caacctcatt tctgcccagc ctactgcat gaatcttctt tgctcagtg tcccattg 36420
 tgacttgggc acagtctct gagccctccc actgtgacac tagatgcagc aggcagggaa 36480
 55 cagtccctcc tgggcagaga aggcacctg gtcccagcag aaaaccaggg ctggaattac 36540
 cttctgtttc ggcttcttct tcagaaatcc attccgtgtg ctgggggcag tctgatgggc 36600
 ttctgggggt ggcagctggg ttacgctgg gggtagacaga tgagggtctg agaaagcagg 36660
 60 cagaggcctg ggggtgagaat ccaccccag cccgagtcac caatcaggct gtcataagac 36720
 ctgtcactct gatgacgggc agctgggctt ccaggcaggt gtcccacaga gcagcagaca 36780
 65 gaggaagag acggcaagga aggtaccagg cggccgcagc agggatgcac gggccgcaga 36840

ES 2 279 916 T3

cagacagaca cagctgcgtg gctgtcagcc acactcaggg agaggcaggc agagggccag 36900
 acgccgagct tacggctact cagcagagag acgccagtgg gtctgtctga ggccgctggc 36960
 5 tgccacccag ccgcatgtgc agagtgggga ggaagaggag gatgtggtga gccgctcccc 37020
 gccagccccg cccacccgca gctgggctcc tcctgggagg gagtggagaa gaggtgggag 37080
 10 ggggcctggc cccacagcag gcacccactg tcaccaaagg tcacctgcaa gtaagacatt 37140
 tggggccatc ggggtgacac ttccctotta gggacctgtg acatcatccc cacaggcctc 37200
 15 tcagtataaa cccatgaggc aggcagtgcc tcctggagcc accacattgc acagatatgg 37260
 aaactgaggc cagaggtgtg aagatgtggc acagtttcac ccgtggagcc agagtcccca 37320
 gtggccgact ccagcccctc agcacagaga gaaggaccag aaccttgccc aagggtccac 37380
 20 ggaagcccct ttttcagact ttgcaaaaca gccctgttct tattcctgag ccttacctgc 37440
 ctaatagggc ctgagcttgg gacctctgc tctggcttga ccccatgcc tctctgctc 37500
 25 catttccctt ggatccagtc tcctgtgca gagctccagg gagcaggacc ccttgggcac 37560
 gtcacatcac ctctctgaat gccctacttt gcccatctgt caaatggggg cacctagcta 37620
 30 tgaggaagag ggcagacatt aacacatgag aattcaagaa gaaaatagag aaaagaaatt 37680
 ctcaagagag ttttcacctt gctaacatgc cagaggccca tgagaggggc agatgttctt 37740
 35 ggaagacatt caagaaacca ggagacaaa tgtaacaagc ttaatgccta gtgcagtctc 37800
 caaaggagag caagagaatt gctaccacca ccacogctac caccaccacc actaccactg 37860
 ccatcaccac cacctcgaat tactttgggt cctacatgat ctcactttat cccacaaagt 37920
 40 gtgaggcaga caagattagt cccattttac agatggagag actgaggccc agaggagtga 37980
 aacgtcacac aagccaagaa gaattagagc tgggatttga acctgggtgt gtttgattcc 38040
 45 taagcttata ccaggctgtg aaaacggggc cataccagga tgaaatgtcc cacagtggg 38100
 ggaggctatt ttatgtgtt ttgataacaa gatgcaattt gtagctctcc ctgctgactc 38160
 50 atttttggga atcaacttgc tgttgacttt cgtgaccact ccagagaaaa aagagaaagc 38220
 gtcttgctat tctttctttc tttttttt tagctgtttt tgaggaactt ggtacaaatt 38280
 cccctgtggc tgatttgagg gatcctggcc ctgtagagct ctcccagct accgaagtgt 38340
 55 gtcgtgttct ctggagaacg aaccttggga agacaccagc ttttgttttt cttctctctg 38400
 atcttcgggg tgaattctct gataacatgc actgaaattt gtagtgggtg aaagatcagg 38460
 60 agaagagaca gtaaaaagag ctaatatatt ctgaaagctc attgtgtgcc aggggtttta 38520
 ggactttaaa gatgcacct ctcatctaaa cctcagaaat actcgagaag gctgtgtgca 38580
 65 gcggtgcaca cctataattc catcattttg ggaggctgag gtgggaggat cgattgaggc 38640

ES 2 279 916 T3

taggagttca agaccagtct gggcaacata gcaagaccct gtctctataa aaaaatttaa 38700
 5 aaattagaca gtcattggtg tgcaagcctg tagtcccagc tactctggag gctgaggtgg 38760
 gaggaccact tgagccaagg agctgaaggc tgcagtgagc tatgactgta gtgctgcact 38820
 caagcctggg caacagagca agactctgtc ttcaaaaata aaatcccca aatgaaaaag 38880
 10 aatgagtcta gaagatagtt atcatcatca tcatcatcgt cctgtttta cagatgagga 38940
 aactgaggct cagagaggtt aagtgacttg tccaaggcca cacagctgat gagtgccaga 39000
 15 gttgggattt gaactcagtc atttgggctc cagagcccgc actcttaact cactacactg 39060
 ctctgggggtg tgtatgaaaa caaggatatt caatttctcc tccctccctc ctgcctgcct 39120
 20 tctttatcta cctgctttct acccaccac ctacctatcc accattcat tcttctctgc 39180
 acccaccac ccagccattc ctgcttctc ccccttaata ttattgagc aggtcagag 39240
 aggttaagtg acttgccaa aatcacgcag cttggctaca tccctgggct agccacaga 39300
 25 aatatacaca cagtgcagc cccatggag cctatattct agtagggaga gttagacaaa 39360
 aagaagtaac agacaaactc aatgtaaact gtactaaatg tcatagaaaa ccaatgagag 39420
 30 atcaagggtg tgacatttg gggtacacta ggtgctaaga agtgcccagc catgggaaga 39480
 acattatcgg cagaaggatc tgcaagtgc aaggcactga ggtaggaaag aatgtggctg 39540
 35 gctccaggaa cttgagaaca gcatggcgta atacagttag caaatggagg aatagtagaa 39600
 ggtgaaggca cggaaatcac acatctacac cacatgggac ctcacgggtt tgggtgagga 39660
 aggtagattg ttccaaagga aatgggaagt catcattgga gggtttcatc ttaagagtgg 39720
 40 cttaatccag ttacatttt cagttcaggc caggagttgg ggaatgggtg ggatcagcag 39780
 gggtcacagt cccttggtgc ttaaaaagta gatgcatttg gagctgccag gcccatgtcc 39840
 45 actggggtaa acatgagtc cctcagaaat agacatgtgg tcccttgagg ggttcctctg 39900
 ggtctgtaa tgtctcataa gtatggcctc tatacccttg gaaggaagggt gccataggat 39960
 50 ctgagggcc ctccaacct gcctcagtgc tgatagctgg tcagcgggga ggaagtggctc 40020
 acatttgcac ttgagccaag gggcctcctg ggaaaaata attgacacac cccctccctc 40080
 55 aaccatttc ctctttttta tttttatttt aagagcttta tttagctatg ttttacataa 40140
 cataaaatca agccactgta aatgtacagt tcaatgattt ttagtgaatt tatcgaattg 40200
 tgcaattata accacgatcc aattttaaaa caatcccatc actcctgaaa ggttccttgt 40260
 60 gcctgcttat agtcaatctc cattcccatc ccaggggcca ctcgtctact ttatgcctct 40320
 actgattttg cttttttttt ttccataggca tctcatatca atatgttgtc ttttggtgtt 40380
 65 agtttctttc agcatgcgt gtttgggggt caaccaggtt gtagcgtgtg ttggcaccac 40440

ES 2 279 916 T3

5 atattctaaaa atccattttt aggccaggcg cgggtggctca tgcctgtaat ctcaacactt 40500
 tgggaggcca aggtgggagg atcacttgag atcaggagtt cgagaccagc ttggacaaca 40560
 tggtaaaacc ccgcctctac taaaaaatat aataattagc ctgggtgtggt tgcacacgcc 40620
 10 gggagattga gaccagcctg gccaacatgg tgaaaccctg ttctactaaa aatacaaaaa 40680
 ttagttaggt atggtgacgt gcacctgtag ccctagctac tcaggaggct gaggcaggag 40740
 aattgcttga acacgggaag tggaggttgc agtgagcaga gctagtgcc ctgccctcca 40800
 15 gcctgggaga cagagcgaaa ctccatctca aaaaaataaa aaataaaaat tgatttttat 40860
 tgctgaagaa tattacattg catagatatg ccacattcat ttatcctttc atgagatgat 40920
 20 ggacatttgg agtatgtcca ctttttcctt tactacaaac aagcatgcta tgaacacttg 40980
 catgcgagtc tttgtgtaga catgcatttt caaatctttt ggatatatac ccagaaggag 41040
 25 acttggtgag tttaaaggtag tttaacttat taacttttaa ataagtttaa cttattaaga 41100
 aactgacaaa ctgtttttca cagcagctgc cctgtattat attcccacca gcaatgtctg 41160
 aaggttccca tttctctacg tccttgacaa tatgtatttt cttttttttt tttttctttt 41220
 30 tttttttttt tttgagatgg agtctcggtc tgtcgcccag gctggagtgc agtggcgcgga 41280
 tctcggtcca ctgcaagctc cgcctcccg gttcacgcca ttctcctgcc tcagcttccc 41340
 35 gagtagctgg gactacaggt gcctgccacc acgcctgget aattttttgt attttctttt 41400
 gtagagacgg ggtttcaccg tgttagccag gatgggtctcg atctcctgac ctcgatgatgc 41460
 40 gcccgctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcggt agccaccgca ccagcagac 41520
 aatatgtatt ttctgttggg ttttattata gccatcctag cggatgtgaa gtggtatctc 41580
 attgtgggtt tgatttgcat ttccctaatt gctaattgat gtaagcatct tttcatgtgc 41640
 45 ttggtagtca tttgcatatc ttgtttggag taatgtctat tgaagtcct tgccaaattt 41700
 tatttatttt atttttttt tagacagagt cttgatctgt ctcccacact ggagtgcagt 41760
 50 ggtgtgatct tggtcactg aaacctctac ctctgggtt caagcgatc ttgtgcctcg 41820
 gcctcccgag tagctgggtc taaaaacgtg tgccaccata tccagctaatt ttttgtgttt 41880
 55 ttagtagaga cgggttttca ccatgttgac caggctgggt tcgaaccctt aacctcagggt 41940
 gatccgcca cctcagtctc ccaaagtgt gggattacag gcataagcca ccgtgcccag 42000
 60 ctcttgcca atttttaaat ttgattgttc atcatttgtt gttgaatttt aagagttctt 42060
 tgtatattct ggaaactcac ctttatcaga tatatgaatt acaaataatt tttccattct 42120
 gtggctgtct tttcactttg ttgatagtgt gctttaatgc aaaaaaatg aaaaaaat 42180
 65 gactatagat tcatgggttt atttctgaac tctaagttca attccattga tctatatgtc 42240

ES 2 279 916 T3

tagccttgtg ccaggattat cacactgttt tgattactgt agctctgcag taagttttgt 42300
 5 tttgttttgt ttttgttttt gtgttgtttt gagacagagt ttcgtctctg ttgccagggc 42360
 tggaaatgcaa tggcacaatc ttggctctgc agtaaatttt aaaaatggga atttgagtcc 42420
 10 tccaacttta ttgttttggc ttttctgggt cccttgaaat ttcacatgat ttttaggagc 42480
 agttttttcca ttttttaaaa aaggccattg ggacttttat aggaattgca ttaaactctat 42540
 aaattacttt gaggagtgc atgttaaate ttccattaca ttaacataga atttaaaaaa 42600
 15 ctttatttag gtcttttcta attttttcag caatatttta tagtgttcag tgtacaaatc 42660
 ttgcacctcc ttggttaaatt ttattcttaa gtattttatt atttttgatg ctattataaa 42720
 20 tagaatttat ttaatttcc tttgggggtg tttattgcta gtatatacaa acacaattta 42780
 tttttgtatg ttgatcttat accctgtcac ttggctgaat ttattagctc taataatttc 42840
 25 tttgtgcgtt ctttagaatt ttccatata atgatcatgt catctgcgaa taacagtagt 42900
 ttttactctt tctttttccc atttgaatgc cttttatttc tttttcttgc tgaattgttc 42960
 30 tggttaaaac tttcagtgc atgttgaata ccagtgggga aagtgggcat cctctttcct 43020
 gatcttgggtg gaaaagtttt cagtctttca ctgatttagt gtgatgttag cttgttagct 43080
 ggggttttt ctttctttat ttctctttct ttctttctct ctttctctct ttctctgtct 43140
 35 ctctcttttt tatttgagat ggagtctcac tctgggtgcag gttggagtgc agtggcatga 43200
 tcttagctca ttgcaacctc atgggttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tcccaagtag 43260
 40 ctgggattac aggtgtgtgc caccacatcc aactaatttt tgtattttta gtagagacag 43320
 catttcacca tgttggccag gctggtctcg aactcctgat ctgaggtgat ctgectgtct 43380
 cggcctccca aagtgttgtt attacaggca tgagccactg tggccagcca ggtttttcat 43440
 45 atatggtctt tatcatgttg agggagtctc ctcttattcc taacttactg agtgttttta 43500
 tcatgaaagg gtgttaaatt ttgtcaaag cttttctgca tcaatttggga tgatcgtgtg 43560
 50 ggttttctta ttctattaat gttatgtatt gtattgatta attttcttat gttgaaccac 43620
 ccttgcattc ctgggataaa tcttttttgg tcacactgta taatcctttt aatgtgctgt 43680
 55 agaattagtt tgcctgtatt tttgtgaaat tttatatcta tattcataag gaatattagt 43740
 ctgtagtttt gtttcttctt ggtctctctg tctggatttc tctcctgttt tgtggaggag 43800
 60 ttgagaaga actgatgtta attcttcttc caatgttttag tggaaattcac cagtgtagcc 43860
 atctgactct ggacttttct tcatggggag gtttttgatt caactcttta cttgttgtat 43920
 gtttattaag attttctatt tcttcttgag tcagttttgg cagtgtgtgt taccaaactt 43980
 65 taatatttaa gttgacaact attattatct aatttcttgg catcacgtca ttcacagtac 44040

ES 2 279 916 T3

tcccttatga tcctttttat ttctgtatga ttgtagtaa tattcccact tccattttctg 44100
 5 atttttagtga ttgtattgt ttcttttgc tagtccaact aaaggcttgt caattttgtc 44160
 aatctttttg aagaaacgac tcttggttcc ttccatctct attgattttg tattctttat 44220
 10 ttgtcttgtt tgcactctaa tctttattat ttccttccct ctgctacctt tgggtttcat 44280
 ttgtccttct ttttttagtt cctttaaaag taaagttagg ttatgatttg tgatcttatt 44340
 tgttgttttt ttttaatgaa ggcattgtagg gctacacatt tccctgttag cactgctttt 44400
 15 gctacatccc ataattctgg gtgtgttttt ggtgctttca ttttcatttg tctctaagta 44460
 ttttctaatt tccctgtgat ttcttcattg acatgatgac tgtttaaaaa tatgctattt 44520
 20 aatttccaca taattgtaaa ttttccagtt ttccttctgc tattgatacc taacttcatt 44580
 gtgatcagag aagacacttc atatgatttc aatcttttaa aatttatcaa gacttgtttt 44640
 gtggcttaac atatagtcag tccctggagaa tgttccatgt gcactttgtg gtcactgtta 44700
 25 ttgttgggtg gagtgttcta tgtgtgtcta ttagctctgg ttggtttata gttgtacaag 44760
 tcccctactt tcttagtctt ctgtctagat ggtctccaac tattattgta gaactgtcta 44820
 30 ttcctctatt cagttctgtc aatatttgc tcatatattt ttgggctctg atgttttagca 44880
 catgtatggt cataattatt atgtcttctt ttttttgaga cagagtgttg ctctgtcaca 44940
 35 caggctggag tgcaatggtg caatctcagc tcaactgcaac ctccgcctcc caagttcaag 45000
 caattctctt gectcagcct ctgagtagc tgggactaca ggtgtgcacc accgtgcctt 45060
 40 gctaattttt gtatttttag tagagacagg gtttccgcat gttggccagg ctggtctcaa 45120
 actcctgacc tcaggtgatc cactcatctt ggctcccaa agtgctggga tgacaggcat 45180
 gageccaccac ctggccaatc ttcttgacaa attaacacat ttatcaacat gtaatgtcct 45240
 45 tgtttgtctc ttgtaacaat tttttactta agaactcattt tatctgacat tagtatagcc 45300
 acctcagctc tctcttgggt tctattttca tagaatactt tttccatcc tttcactttt 45360
 50 aacttatttg tgtctttgga tataaagtga gtctcttgta gacagcatgt agttggatca 45420
 tgttttttaa ttccttctgt caatccattc tgtcttctaa tcagtgaatt taacttactt 45480
 55 acatttaaag tgattcatga taaaaggctt accactgcat ttgctattc atttcattta 45540
 tatcaaattt tcttttggtt ttcaattccc tcattacctc ctctcttgtt attgattgat 45600
 60 tttcttctag tgcaccattt tgatagcctc ctcatctctt ttctgtatat ttttagttat 45660
 tttcttagtg gttaccttga ggtttacact tcacaggaaa tttatacaa tatagtatga 45720
 attgataaca acttggttta aatagcaata caaaaactct actcctatac agtccctct 45780
 65 actctattct actcctatcc ctccccctct ttgttgtca ttatcacaaa ctacatcttt 45840

ES 2 279 916 T3

atgtggcatg tgotcattag catagattta taattatatt tatgtatgta tcttttaaat 45900
 aatataggaa acaaaaagag gagtcataag ccaaaaatat aattatacta gtttttatat 45960
 5 ttacctttac tagtggtctg tatttattca tatggctttg atttactgcc tagtgcctt 46020
 tcatctcagc ctgaaagact ccccttagtg ttttcatag ggaaagcctc ctagtgatga 46080
 10 aatacttcac cttttttttt tgcaatcttt gaatgtttta atttcttaat cattttggaa 46140
 agatagtgtg gccagataaa gaattctcag ttggcagggg ttttcccttc agcactttaa 46200
 15 atatatcacc cttctgtctt ctggccttgg ggcttctgat gagactttgg tcattaatct 46260
 tgttgaggac cccctgtatg tgacaagtta cttctctctt gctagtctcc agattctcga 46320
 20 tttgtctttg tctttcaaca gtttgattat aatgtgtctt ggtgtagatt cctttggttt 46380
 taccctagtt ggagttcact gagcttcttg gatgtatata ctcatacctt tcatcaaat 46440
 ttggaaatgt ttggccctta ttcaaataat ctttctgggc ctttctttct cctcctctg 46500
 25 ggattcacat aatgcataatg tttataacct tttttttttt ttgagatgga gtctcgctct 46560
 gttgtctcac aggtctctca ggctctggtt atttttatct ctttttactt tatgtctctc 46620
 30 agactggatt atttcaattt acctagcttc aagcttattg attctttctt ctgcctactc 46680
 aaatctgggtg ttggagctct ctaataaatt tttcattttg gctattatat ttttcaggtc 46740
 35 caaaatttct atttggttat tttaaataat gtctagctct tattgatatt atctacttgt 46800
 tcacacgtag ttctggttta acttagttct tcactcatgg tttcccttag ctttttgagc 46860
 atatttaaga caattgattt aatgtctttg tctagcagct ccaatgtctg gactttttta 46920
 40 gggacatttt ctatccattt tcccccggtg aatgggctgg gtgttcctgt ttctttgtat 46980
 acgttatagg tttttggttg aaacttggca ttttgaatgt tacaatgtga taattctaga 47040
 45 aatcacattc tcccttcccc tgtccacaag gcttgctttt gtcatttgct gtgagcttca 47100
 gccattcatt tacttagtga cttttccaaa ctatttttgc aaagactata tccctttttg 47160
 50 tgtatgttca ctgaaatctc cattctgtta tctcagcagt tggtcagtga tctgtaagag 47220
 gtttccctat atacctgcag ccaaaaagaa aaacaaaata aaagatactc cctagtctt 47280
 55 tgtaaattgg ctctgagctg ggatactcct ttacacttag ccaggcagac tacaattctg 47340
 tcttagcctt cacctctgct tgtgcagagc ccaattagcc agagggtgcaa gcctaggatc 47400
 atctcatatc atttctgtgc atgacttcag cctggggcat atgtgttata ttctagattc 47460
 60 cctgggtatac acggaagctt ttcaaagccc ttattcccc atatacatc ctcccttagtc 47520
 tttttcttct ccagcttttt ggctgggtctc tgctttttgc tttgtctgtc atcctttgct 47580
 65 ccacatgggt agtgtgtgtc tttaaagttt gtcaacagac attgcctggg aagctgctcc 47640

ES 2 279 916 T3

agcctagagt tcaggggaag tgggagggca aaacaaaggc aagcacctga gtggatcctt 47700
 tagggagatg ccaaacagat caaaatgtag aaacacaatt ctttgagacc aaggcttgtg 47760
 5 ttgttctttc tgggtaccagc aagccatgcc aagaatgcag gctactgtac tcatagccac 47820
 gactaagctg atgaatgtga gatggtaggc aagtaagcaa aaatgctaca gtatttttctt 47880
 10 accaagaatt agcagccttt tctgggttgc aaagggtttt gatttagattt caggttccaa 47940
 aaaagtttct tttgacactt tcttccagct taatgtttgc tttagtggag gaactgatcc 48000
 15 ttggagttcc ttactctgcc atttttaaatt aatgtactta atggtgtttt ttttcttttg 48060
 aagcataacc cttttaaatt ttattgaaac ccaatttatc aatttttttc ttttgtggat 48120
 20 tggacttttg gtgccatata taagaaatct tcacctatac caaagtagca aaaatctcct 48180
 ctcatatttt ctctaaaaag tttaatagct ttagctcttg catttttatt ttttattatt 48240
 tgtttatttt ctgagacagg gttttgctct gttgccaga ctggagtcca gtggctcact 48300
 25 gcaatctcag gtcactgcaa ccttggcctc ttgggttcaa gogattctcc tacctcagcc 48360
 tcctgagtag ctgggactat aggtgcatac caccatgtcc gcccattttt tgtatttttg 48420
 30 gtagatatgg ggtttctcca tgttgctcag gctggtcttg aactccgggc tcaagtgate 48480
 catctgcctt gacctccaa agtgagccat tgagcccagc cttacctttt taaaattatg 48540
 35 attttgactt aattttgtga atgctgtgag gtaatgatct aaatttatct ttttcatat 48600
 aaatatctaa atgtttcagc acaatattta gaaaagattg ccctctccct tttgaattgc 48660
 cctgacacct attttgataa ttgactataa atatatgggt taatttcttg accctgtatt 48720
 40 ctgattcatt gctttatag tctatccatt tactagcacc ttactgcctt gattgctgta 48780
 gctttgtagt aagttttgaa atcaggaagt agaagtcttc caaatttggt ctgctttttc 48840
 45 agaattgttt tggtcattct gagtccttg catttccatt ataaatatta aattccatat 48900
 aagtttcagc ttgctaattt ctgcaaaaac tctactgga attttgacaa ggattgtctt 48960
 50 gaatcaatag atcagtttga ggaaatctac caccttaaaa acttgagagc tttcaatcct 49020
 ggatataggc actctctcca tttattttaga tctttgaaaa ttcttctcag acaaccgctt 49080
 55 cctcatccat tcattttttt aaattaattt tttattgtaa taaatacaca tcacatgaca 49140
 tgtatgatat ggtttggtg tgtccccacc caaatctcat ctgggattgt agctcccata 49200
 gttcccacgt gttgtgggag ggagcctgtg ggagataact gaatcatggg ggtggttttc 49260
 60 cctatactgt tcttgtggta gtgaatgagt ctcacgagat ctgatggttt tataaggaga 49320
 aacccctttc acttggttct cattgtcttt tgtctgcgc catgtaagat gtgccctttg 49380
 65 ctttctgcct ttcacatga ttgtgaggcc tccccagcca catcaaactg tgagtcatt 49440

ES 2 279 916 T3

aaacctcttt ttctttataa attacccagt cttgggtatg tctttatcag cagcgtgaaa 49500
 5 acagactaat acgatgtacc atcttatcca attttaagt taagttcagt ggtatttaact 49560
 gatgcattcc tttctgaggt ccaacattgt ggggttctctg taatggacca gatggtctgc 49620
 10 tgagagccac agccaagaaa gggcagggga tgtttcatgg ggagcaaacc acaaaggaag 49680
 gagacgtcta gagggtctga ttgtgcgcaa catgtggctg aaactgggaa ccccttttcc 49740
 actcagttac cctgagacag cagggtttatt ttaagagcga tggtgaata taaagaaaaa 49800
 15 actaataaat agtgcctca gttatgagta acacagaaag aatatgttta tcctgcctta 49860
 aaagctcatc ttgggttgta ttaggctctg gactaatagg ggtatcattt aagcagatga 49920
 20 taagactaag aattttgtaa atttcttcc aaaattagga tctctaattg gctgatcaga 49980
 ctgccctagc cattgatcac atcacttgc ttttggcaca tgagtttgtt cttgggtggg 50040
 25 ttccccaga ggcaaattct aagacaagga ttaaggata agtcatagat ttgggaaata 50100
 atcctaggaa acacagggga atggagaagt ggggcaggca aagcgaggaa gccagtaaag 50160
 ggcgctttaa ggagaaggcc actgctgttg gcaactggag ctgaatccca ctgggtacct 50220
 30 ctctgggaga caatatagaa catgtctcca acttgtccca aaggagaaac aagaaatctg 50280
 ggatatttct ttccaggac ttcatgtgtt gttagttgag ggctgcttcc agggccacga 50340
 35 ctctctgaca ctccagctt gccgattgca tgcacctgtt gccaaaaatg aacctcacg 50400
 caggagttg cagggtgttg cagtacaaat gctttggtgt ataaagctga gaagttaagg 50460
 gtaaggcttc aacatctgct acagggacca tgataggagc aattaattgt gtccagctt 50520
 40 ccatcttgte cttctttctc atatcaggac catagtgtaa ttctggatgg caacagaccc 50580
 agctaataka ccactttcca gtttcccttg cagctagtga tgggagtgtt cacatggacc 50640
 45 ttctggaagc actctgtggc cttccagta ttcccttcc tcttttctcc tgcctaaagt 50700
 gtacacgtga tggctggagc tcaagcagcc atttagaact aaagaaaaag aataggataa 50760
 50 tcacagagaa cttggccctg atatcatggg tcatgaacaa atgtcagcaa tcatttgtct 50820
 ctagacttct cgttccataa aggaattagc tcttaagtgt ttaagccact gtgggtggte 50880
 55 tctattagaa gttggaactt ctaaccatac aaggggattg agtgactatc aaaaggatga 50940
 agaggcttat ctgtgtacc aaactggtga agcaagaaat aaccaggtat gctgtgtgta 51000
 60 taaagtactg actaggttga aataaatcat gaagagaggg ttggatgaat aatttataaa 51060
 acatctgtga aacagaatac tctgtagcta tgccatgtga ggacataaca agaaggtggc 51120
 tgtctgcaag ctagaaaggt tgttcagaag acaaccatca accaccttga cttagactac 51180
 65 cagcctccag aagtgtggga aaataaactg ttgcctaagc cacacagtct atgggtattt 51240

ES 2 279 916 T3

gctatggcag cctgagctga ctaaaacaga tgtatctgta ttagtcagtg ttctccggag 51300
 5 aaacagaact gtaaccaaca caattattaa taacaataat acaaaattgt ttacagttgt 51360
 aagggacttg ccatctgcaa taagctatca aaaccacctt ttattttaat ttgtattttt 51420
 10 tgagacaggg tctcactctg tcgccccaaac tggaatgcaa tgggtgtgatc atgggtgtgat 51480
 cactgcagct taaacctctc aaactcaagc cattctccct ctccactctc ccgagtagct 51540
 gggaccacag gtgtgcacca ccgcgcctgg ttaagtttta aaaagctttt tgtaggaatg 51600
 15 aagtctcatt atattgccag ggctggtctc aaactcctgg gttcaagtgg tcctcctgcc 51660
 tcagcctcct aaagtgttgg gattacaagc gtgagctgct gtgccagcc ccaaactacc 51720
 20 ttttaatatc cccatttttag acataagaaa acaggtgcag gagactaagc aactggcca 51780
 caggcacata gccagtaagt ggcggggtca agatttgaac ctgggccgtc tagcctcaag 51840
 25 ggttaatagg cccatttctg ggtggtggga atttttattt ttaatttttt atgttattct 51900
 gtattatctg atttttaaaa tgatatctta ctctcggaat ctgggaaaaa taaccaagct 51960
 atttccattt tgaagagaaa aaaaaaagga catcacaaaa catcagtatg gtgggaaaag 52020
 30 ggtgcagaga agggaaggta taaaaaaatc tatagagatg tgagccatgg tccccctgaa 52080
 gcatgtgacg tcctttactt caagccagat attcaattac atgtatatga agattagaac 52140
 35 cacagaacca acatgtcaca tggaaaatgc ttgcgagatt ttcccaaagt caagagtgtg 52200
 tcacagccaa ggggaacctg aagcacccta gggttgcatt aatagaggta tgggtgtccag 52260
 40 aacaagggag gctattctca ctgcactggc cacaccttca gtctacgtcc agttctggac 52320
 cttcattttt aaagaacatt ggcaaattga tgtatattca gaacaggcaa ccgagaaggt 52380
 agagcagctg gtgtggagac agtaaaaaaa accatgagac agcagaagta tttggaaaga 52440
 45 gaagactcag ggtgggggtc atgagcaggt ccagaccagc atagtcagag ttgatgaact 52500
 ggagaagaca gtgagctccc tgtccctggt atgtaaacia ctctcactg tgggggtatg 52560
 50 gttggattaa ctgagtgtgt ggttggaaca agggcaatga agtctcctt catgctgagt 52620
 gtctgtgtgt ctctgattct tagaaagaca taggagggct taccatggag ggagataatt 52680
 55 atggaccgaa tgtgctgctt tcaacctctg ccaaattcat atgctgaagg cttaaccac 52740
 aatgtggctg tatttggaaga tgaggccgtc aaggaagtaa ttaaggtgaa atgagctcag 52800
 aagggtgga ccctgatctg ataatgttag tgcccttata agaagagaca ccagggagtt 52860
 60 tgccctcaat ctccctcaca gcaagaaggc agctgtctgc cagccaggaa gagagccttc 52920
 atcaggcatg gattcagctg cttttctttt ctgactgcag agctggggag atgggagttt 52980
 65 accaaagttt tccagatgct gcacagagaa ttcagggtgt gcactgaaa tgtgcctacc 53040

ES 2 279 916 T3

agagactggc acaaatgcgc gaaggaatct cctttgcatt ctgatcccta atgttattcc 53100
 5 tggaccaact tgttgatcat ggactttcca gcctccagaa ctgtgagaaa taaacgtctg 53160
 ttgtgcaaac caccatcca ttgtgttata gcatcctgag cagctaagac agaggggttac 53220
 agcaaccact gagctgattg ggcacctctg caagctttct cttaggggac cctggggctg 53280
 10 agccccagcc tccaagttca ggggtggggg tgcggtgggg tgagctgatt acagtcttag 53340
 ggcagaggag gaattgccc tcttctccct cccctgccac ctccaaaatt ttcacagtta 53400
 15 acaaaacaga tcttcttttc actgtcaaag gtttttaaatt caatgggaag ggggatacac 53460
 aggtctaaaa gcaaagcact tgagttagtg gcatgtacta agtataagag gtactgccgg 53520
 20 gcatggtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttggaagg ccgaggcctt aagctcttaa 53580
 acacttaaga gctaattccc ttatggaatg agaagtctag agacaaatga ttgcttaggc 53640
 cgagacctaa gatcaggaat ttgagaccat cctggccaac atggtgaaac cccatctgta 53700
 25 ctaaaaatac aaaaattagc cgggcgtggt ggcacatgcc tgtattccca gctcctgggg 53760
 aggctgaggc aggacaattg cttgaacccg ggaggtggag gttgcagtga tctgaaatcg 53820
 30 tgccactaca ctccagcctg ggtgataaga gcaaaagtcc atctaaaaaa taaaggtact 53880
 tataattgtt gctgtttact agactagtat gattattatt aacagcagta gcatattgtc 53940
 35 tttgtttttg tttttgtttt tgttttgttt tgttttgttt tctagtcttg atttactctt 54000
 ctcttggtca ctgtatccc gctgtttctg agatateatg cccctccat tctcagttcc 54060
 tttccctagg agcgtgcatg actctagcct aaaccaatcc actatattcc ctaagccaca 54120
 40 ttaacagatc cagtcagagt ctaacagatc ccacgagact ctagagggat tgatcagggc 54180
 aaagactccg cacttggagc cgggagaacg tattcatgtg ttcctgcag ctgctgtatg 54240
 45 tctctgtggc cacacgggag aaactgcctc aggatggggg cgacctggaa gaagtgactc 54300
 aagagatgaa ctgggccatc aggaatcagg atcccttgat ccagctatgc ctgaaagcca 54360
 50 agacatttta gttaaatagg acaataaatt cctctctggc ttcagccagt ttggattaag 54420
 taagtctctt tcaattgaaa ctgaaagaat cttgacagat acattactgt gtgaccttaa 54480
 55 agtgctataa tgggtggttg tacaaaagtgc tatgacagca gacacgagcg acccctgatg 54540
 atactggcca cagtgtggag ggagtgtcag ggaaggctgc atggaggagg ggtcacttgt 54600
 tctggccttg gaagyatgaa gaacagttca gcgtgttgaa aatataggag agtgcatttc 54660
 60 aaaacgttct gaaaatgtgg acaggaaacc aagaaatacg cttctaaatc acccaagaga 54720
 caatgagaaa aattgcaatg gaaaattaga aaacattttg aactgaatgg ttttaaaaaa 54780
 65 acaaccacat gtaaaactgt gggttgcagc taaaaaagta ctgagaggga aatttgtagc 54840

ES 2 279 916 T3

cttaacagtc acagattagc aaagaagaaa agctaaaaat taatgttcca aacgtctctc 54900
 5 tcgagaagtt agaaaatgac agtgaataa acccaaaaga aaggaaagga aaattataaa 54960
 gatcagaatt ggctgaaaga ggaaggaagc acagcagagg gccaaccaag cctggagtcg 55020
 gttctctggt aagccaaaga catgagggcg tgacttcccc gcctgttcgg ggaatgatga 55080
 10 gggccctggt gtgggtgggg agggcagagg gggacaccag agcaaggagg aagtgtcgag 55140
 gccatagcct gctggcgaag acagtgccag agcctggaga agtttccttg tagagcagcg 55200
 15 ggagcagaac cccaccccat cgacggccag agccatgaga ggatctcagg aggggagtgga 55260
 tgggagcaag ctacctttgg tccctatcca actgggctgg gaacttgtag ggtcctggga 55320
 20 gactgtctgc agatgaggggt atgtggcccg tgtgcctagg tctgattgga aaggagaaga 55380
 taagccacag aggataccaa gtttagtttt ccaggaaccg gcctctgtcg ctggggaaac 55440
 tgccaccaca gctgctgggt gtccagtgcg accttggcac aggctggctt ccctttcagg 55500
 25 gaggggcacc cagaccattt gagtgggtgc tgagaaggcc ctggagggtt ggggggaggg 55560
 tgccgagcta cggcatctcc agcccttcaa tagaatattt ggcagggttt ctccaccttg 55620
 30 atagtgttga catttgggct ggatcattta cggtgggggc catcctgtgc atggtgggat 55680
 ggtgaccagc atccctggcc tcttccactt agatgccttt ccccagttg tgaccaccaa 55740
 35 aggtgtcccc tggagggcaa aattgcccc aggttgagaa cctctgattt catgttgtag 55800
 ggggaggagc actggaccca gagtcctaca gaagatgtcg gcagtgccaa actcatccgc 55860
 tagggctgca tgaccccagg caagatcctt cctctctctg agcctctaca acccctacct 55920
 40 gccaatgtg gtgagaatac ttacccctgc cccagagata attaggagga tgctgtgcct 55980
 ggaagagcag gctgccacaa acagcagagg ttaggtggga atcattgcc ctgtacctgg 56040
 45 agcgaggcta aagagctgaa cggcgtgtgg ggcggggtcc ccatggtgac aatagcatga 56100
 tctttcttgc ttccttgctt tctctacca cccaatccc acccgttggg aattcctggt 56160
 50 ggttccactt tcaaaacatg cccagaatcc acagctgtgg tcgccgctg ctctggacat 56220
 tggaaaatta gggcctcccc taccaaaaac atccccctct aactgcagcc agaatgatca 56280
 55 ttttgagaca atcatotgat caagtcaact ccacatccaa agccttccta tggttggtea 56340
 aacaaaccct aggtcctgtg tgtggccagt aaggccctcc gtggctgate cccattgcct 56400
 60 ctgaatttgt ctctttctc tccccagtt ttctgactct ggcctcctgg ctgcaccccc 56460
 ttacgccaat tcccttccca gggccttcgc acagcccgct cctcctcct agaacaatct 56520
 ctttctccct gtccctccag atatctgctt ggctcattcc cctagttcac tcaagcctct 56580
 65 attcagacct ccttgggtgag gtctttcctg gcacctccta aacagctct caccgcgtaa 56640

ES 2 279 916 T3

tttccctggg cccctccctt gectgtctgt tctgcatagc actcaagccc tctgacgtca 56700
 5 cactgtgggc tcacctgcac atcttttggc tctctgtcct cactaggtgt cacttcacga 56760
 gagcagggac tctgttctgc tcaactgcaga accttctctca gtcccttttag ggcagtgcct 56820
 tgcacacagt aggtgctcac taaaaagtca gccctgcttc agccccactt aggattcact 56880
 10 ctgggaaaaa gaatcacccc tgccccctg agtcagggtg gccacaaat ggcaaggcct 56940
 cttcagttct aaatctcaca tgtgggtcac acagctctgc ctttccctcc ggctgaatta 57000
 15 gcccttcacc tcacctccc ttcttgcctg atgtgcttca gccggaatgg gttgtttcct 57060
 cctggctccc acatgggccc tgctctctac ctgggtgcatt ctttctgttg ccatctgttg 57120
 20 gaaaactagt tccagtcctt cagattttta cttagatgtc atctcctcca ggaagctttc 57180
 cctgattgcc caagtctggg tcaattgtcc ctctctgag cccaagcttc cgagtcttgt 57240
 tatgaacaca ctgcattgtt gttgcttatg cacttgatcc caatcccatg caggtagggg 57300
 25 ccagtcctgt atccccagg gccctaggaca gtgctgggac tcaagaaacg tgattggagt 57360
 gaatcagtgg atgaatgaat gctctgaatg acaccacctc aaaggacctg gagcattctc 57420
 30 cttaatcact cttgtgggtg ccaatctctt tgggcgcctt tagaagcact atattttctt 57480
 cctgagtact gcagctcttt ttaggcccc tgaaggcacc tggctctttc agttttatgg 57540
 35 gcatttgtga aagaactcag cccaacagac ctctgatggg cacacctaga accacctcca 57600
 aatggattca ccatggcaca tgctgggacc accttctacc ttggagagag cttccacccc 57660
 attctctcat ttctgcctcc cctaaacagt gagctggcct ggaaaagtct ggctctcca 57720
 40 ggtggggagg atggagtcag gtgactatgt cctctttgat gagtgggcag tgaggctccc 57780
 caagaagaag gggcaatgct gagtagagac ccttcccca cctccagtc atctgagacc 57840
 45 atgacttggg tatcttcttg gaaccacat ggtaatcttg gcacccatca gagactgtcc 57900
 ttgtctctct agggctggga tgggggacat gctggaggac ccagatgtgc acaccacagg 57960
 50 tgcccacaac acacaaatga aaacagcagc agtagcaggt gttgagtact tactcgggtg 58020
 cagatgctag tatcttattt attccactaa acaactccaa gtctgtgttg ttgctggagg 58080
 55 cttagggctc ttgggccaca tgtggggctg aaaataatcc tgatctctgt ccgtctgtga 58140
 taagagctag taataataat aatgtctgcc ttctgtgtgc tccctgtatt cctgtattag 58200
 tctgttttca cgctgctggg aaagacatac ctgagactgg gcaatttaca aaagaaagg 58260
 60 ttaattagac ttaacagttc aatatggctg gggaggcctc ataactatgg ccaaaggcaa 58320
 ggaggagcaa gttacatctt atgtaaatgg aggcaggcag agagcttgtg caggcaaact 58380
 65 cccgttttta aagccatcag atgtcatgag acttattcac tatcatgaga acagcacagg 58440

ES 2 279 916 T3

aaagacctgt ccccatgatt caattatctc ccaactgggtc cctcccacaa cacatgggaa 58500
 ttatgggagc tacaagatga gatttgggtg gggacacaga gccaaacct atcaccccc 58560
 5 aacaagagaa ggcaggcatt attactagcg catatcacag atggggaaac caagccacag 58620
 ggaatttaag taacttggtc attgtcacac agataagaag acatgaacct gggattcaaa 58680
 10 cctggacagt tcggctgcag agcttgagct gttaacgatg acactctcat ctttttcaca 58740
 aatgcccaca caagtccct tctgtacata tcaacatate tcacttacat atatgtgcaa 58800
 15 atcagcatat gaaatccgc tcttgcctcat gcactcatgg acacatacaa cccaatcaca 58860
 aagacataga ttctcctgta gcatgaaatt catcatacat cgtcaatagg cagcgagaat 58920
 20 tcacccgagt cagccacatt tacacacagg tgtgcatgct cctgttaata tgccctgcgtg 58980
 aaaagcatgc agaaccgcca ctcaacaagt cacacatgtg caagtacaca cacattgtca 59040
 cataggcaca gacatatata tgtgtgcaca cttgcatata aacatttctt gagcacctac 59100
 25 tatgtgccag gcactgtgcc gggtctcggga atataaaagt gaagaaaacc gagtttctac 59160
 tctctcagag tgtgtaatcc aggggagggg gaggcattgc tgagcaaatc agatagaaag 59220
 30 tgcagtggct catgcctgta atcccaacac ttttagaggc cgaggcaggc acatcacctg 59280
 agttcaggag ttcaagacca gcctggccaa catagtgaag ccacgtctct actaaaaata 59340
 35 caaaaattag ctgggcaagg tggcgcatgc tgtaatctca actacttggg aggctgaggc 59400
 gggagaatca tctaagcccg ggaggcagag gatgttgag tgagccaaga tcgtgccact 59460
 gcactcaagc ctgggtgaca cagcaagact ccatctcaaa aaaaaaaaaa aaaagaaagc 59520
 40 tcatagttat ggagtgetta ttatgcataa gttgcagagc tgaatctgcc tcatgcatta 59580
 ggggtccgta aacaccacag ccccatgct tacatgcaca catatgaata taaacctccc 59640
 45 tccctgcaga agccacatgg cacaacctgg gcccttgaca ggagtggatg ggtgtagggg 59700
 acggggatca gcattatttt cagccccct cgtggcccaa ggacctcaag cctccagcaa 59760
 50 ctccctgag atgagacct ggctgtgag acaaaatgca catgcaattt gcagacatgt 59820
 gtacatctct ccacgtgctt gtatgtgtgc aggtccctca gcagtcccc attctctca 59880
 55 ggacctcccg cctatcaag agccctgtc cctaagtcac caacctctc cccctacct 59940
 catcttgca cttagggacc tgtgggacgg agacatttg atcttccaag acgctgcaca 60000
 cacaggcgga ggtatgggctg caatgactcg gcttccaggc agctgtggtg agtttctgca 60060
 60 aagactccct tcccaaaaga ggetctgctt tactgaaagt tcagggttgc gtggtttccc 60120
 cgcattcaca tgggggaaag gtcagactct cacaaaaata ttaccaaga actgtctgtc 60180
 65 agtcaatcaa caaacattta cagacagctg ctgctcacaat gctggggaga gaggggggat 60240

ES 2 279 916 T3

gaataagcac aggccttgtc ctacataaaa gctcaggggc catgagggag ctgtgattga 60300
 5 cccagcaagg gacacagtgg ccaggaagag ggaactgctt gtccaaaacc tggcatcaaa 60360
 agagtgtgcc ctggtgagac caaaacaacc tttttttttt ttttttaatt gagacggagt 60420
 cttgctctgt cgcccaggct ggagtgcagg ggcgcgatct cggtcactg caagctccgc 60480
 10 ctcccagggt cactccattc tcttgccctca gcctcctgag tagctgggac tacaggcacc 60540
 cgccaccatg cccggctaatt ttttttgtat ttttagtaga gacgggggtt caccgtgtta 60600
 15 gccaggatgg tcacgatctc ccgactttgt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgtc 60660
 ggaattacag gagtgcagca ctgtaccag ctcaaaaaca ccatttttta tggccccctaa 60720
 20 aatcacaacc agtgggtgtc tggtaagcca acaaaaaca caggaaaca accaaaaacc 60780
 caatatgtgt gtttgctgca aaatcctgaa acacgggtgt tgctgctttg catggtgtag 60840
 atagtctcat tgtggccaat ttcaggctac caaggtgatg tcaggggctg cggaggcaaa 60900
 25 gatgaccaca ggagctggtg caagctggac tcaacacact gtttcttccc acagacacca 60960
 ggaggacaga gccagagctt tggtgccctg aacagagtaa ggagtctcag ttagaagtgc 61020
 30 cagggacaag acccaaacct ctgtttcctc ttttgatgca tattccgacc tgttctttca 61080
 ttcactcagc acttaccctg tgcaggtae tgtgcacctg aagggtgtga gaccattgct 61140
 35 gcctgtgctg atggggaagt actggtgtta aggagcccag aagagaggca ttaaccaatg 61200
 cctggggagc tagaggactt cctggaggag gtagtatcta agctgaaatg gaaggagta 61260
 aagcagcaag tgaggggtag aaaagagtta tttgcaagca gaggaaatag gatgtgcaac 61320
 40 agcttagtga tctcatgcac cactgggttc cccagcaaa agcatcctgt tgagcagatt 61380
 ttgtaaatga accagacca tcctaggtgc tttacaagta ttcaactcatt taatcctcag 61440
 45 acgatcctat ggggtattta atattcttag ctcccttgta cagatgggac cactgggaca 61500
 gatggaagtt atgaataagt caatatgcc aagatcactg gtctgccctt cctctccacg 61560
 50 atgctacctt gaagcatctg aagtaggtgc agcttgggga aattttaggg ggtaccaga 61620
 tatgggaaac aactgtaaat ttaattctgg gtttaatgaa atgtcagagt gtgggaagtg 61680
 atgggttcag tccctccctt gctccctgcc agcccttcac acacaaagac aagagtattg 61740
 55 tccatcatgg acacattgac cgaggctgtc ggtcagccag tcaacagaga tttgtcagaa 61800
 tctttatgtc ttggtctggc ctaggactgg gatgtttgca gtgaacctct gctcacattt 61860
 60 ttgttttgtt tttccttttt tttttttttt tttgagacag agtcttgccc tgttgcccag 61920
 gctggagtgc aatggcaca tctcggttaa ctgcaacctc cgctcccggt gttcaagcga 61980
 65 ttctctctcc tcagcctcct gtgtagctgg gattacaggg gcattgccacc acgcccagct 62040

ES 2 279 916 T3

aattttttgt gtcttttagta gagacgggggt ttcacaatgt taaccaggct ggtcttgaac 62100
 5 tectgacctt gtgatctgcc caccttgccc tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc 62160
 caccatctt ggcccttgttt tgtttttcta ctgaacactt aatctgggct gggctctagg 62220
 ctgaggattg gggcacagaa gaagtaatga atctgtgtcc ctgtcatcaa ggggcatgat 62280
 10 aggagacata caggagacaa ggttttctgt atgtttgaaa tattccatga tttaatataa 62340
 aaaataattt ttatattaaa ttttagacac aaggctcttgc tctgttgccc aggcctggagt 62400
 15 gcagtggcac gattatgact cactgcagcc tcaaactcct gggcttaaac gatcctcctg 62460
 cctcagcctc ctgagtagct gggactacag gcgcaagtag tcaattgcaa taaatgacga 62520
 20 ttacaataag tgatcgaaga ggcccaagga caaaggagag aacaattctg ccccccctcg 62580
 aggggaggac tcacggggaa aggcctgctg ccactgggcc tgagaagatg atattttaca 62640
 gcagttgcca gggaaatcagg ggaggacgat ttggacctac agatatggat aaggattttg 62700
 25 gttttttttt agagaagagg caatggtgga aatgttcttg aattacatag tggagatgtg 62760
 tgtactacaa catttgtaat acactgaaac ccactgagtt atatatattt aagtggttga 62820
 30 aatagtgaat ttacgtcat ataaatttta tctcaataaa aaataagctt atgactgggt 62880
 gcagtggctc gcacctataa tccagcact ttgggaggcc aaggcgagtg ggtcacctga 62940
 35 ggtcaggagt ttgagaccaa cctggacaac atggcaaaat gccatctcta ctaaaaaata 63000
 caaaaattag ctgagcgtgg tgggtgggtgc cagtaatccc agctactaag aaagctgagg 63060
 caggagaatt ccttgaacct gggaagcaga ggttgcagtg agccaagata gtgccattgc 63120
 40 actccagccc aggaacaag aatgaaactc catctcaaat aaatacataa ataaataagc 63180
 ttatgtttca accacagggg gctttctggg tgtaagtgc aaaaatgcct gtttaaaaac 63240
 45 aaagttagg ccgggcatgg tggctcacac ctgtaatccc agagctttgg gagactgagg 63300
 caggagaatc acttgagact aggagtttga aatcagcctg ggcaacattc agcctgggca 63360
 50 acatagcgag acaccatttc tacaaaaaat acaagtatta gccaggcgtg gtcacttgtg 63420
 cctgtagtct cagctactca ggaggctgag gcaggaggat cgtttaagcc caggagtttg 63480
 55 aggcctgcagt gagccataat cgtgccactg cactccagcc tgggcaacag agcaagacct 63540
 tgtgtctaaa ataataataa tacattttta aaataaataa gaagtttatg aatatagttt 63600
 caggcatgga tagatcaagg ttctcaataa atttcttcag gttggaagg tctactctgg 63660
 60 gatctgcttt cttttgtatt ggcttttagtc tcattctcaa gcaagctgag gaagcctcat 63720
 tggtagccaa agaaaagcag ggacctcaga agccaagacc taccacctac cagctttcaa 63780
 65 agcccaaagg aaagaaggca tgttttctta atggttccaa tgatgctacc aggaaaagct 63840

ES 2 279 916 T3

5 ctcattgggc agttttaatc atatgcctgt ccctgaacca atcttcagat tgggaaagga 63900
 atgctctgat tggccaagcc tgagtcattgt gccctgttgg aaagctagga gttagatcag 63960
 10 ttctctggca gttagatcag ttctctggaa ctgcgagtgg gaagacgctg tcccggcaag 64020
 gaccaccagg tggatgatgtc agaagaaggg agagtagata cagggcaggc aggatagccg 64080
 ggttcgtccg gaagagtggg agggaggggg gtgcctgcc aagggaaagg catgagaaaa 64140
 ggcttggagg ttgaaattgc atggtgtggg ctgggaactg tggctgggtg gtggcgtgta 64200
 15 gtcagatgat ggtgtctaga ggggtcaggc catgtgtctg aagacatgag aagcctcact 64260
 tctcactttg aaccagggcc aggtacaaag aggtttggac agggcctgta cgccagtgtt 64320
 20 gccc aaactc tcatccctat gcacacaagt catctctgcc gtattttacat tttttctcca 64380
 tcattacatt ttcttcatat tggcctctc gctttgttta aatcacttta ttgtcaaattg 64440
 aaacattgtc accatcacac atgaaagatc aggatccttt actgtaaata gaaggggaact 64500
 25 gtaaaaacaa gcccatlgaa accaaaaccg agtgattaac ttccagctag atgctgcagc 64560
 ctgtggtagg ctaatctgga gaagagaaag agaactgaaa aaggaattgt tttctcagct 64620
 30 cactatgccc acatgccacc taaaatcatc ttagggaccc cagggagcag ggaaggacgc 64680
 agtcacaaag atggtcctgg tcttggcatg ggggagtgtt tgataaagac actaccggca 64740
 35 taaaccagg gggtacaata gggaggctga catggctgaa cagaggagct ggagagcagg 64800
 gtcccaggga cagactcaca gtaccggaag ttctgcaggg aggaaggagg tagtcaattg 64860
 aggagcacc gctctcttgc tttagcaatc aaaaccagga accagaagga ggaggtttgg 64920
 40 cgaggatgag aaagagctcg tttggatata ctgaatctga gatgtgggga tgtctctgtg 64980
 gagatccatt catctgttca agaagtattt atttatttac ttatttttgt gtattttattt 65040
 45 agagacaggg tctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggc gtgacgtgg ctcactccaa 65100
 cctcgacctc ctgggctcaa gcgatcctct cacctaagcc tccccagtag atgagactac 65160
 50 agttatgcac cgccatgcct ggctactttt tgtatttttt gtagagatgg agttttgcca 65220
 tgttgcccag gctggcttca aactcctggg ctcaagcagt ccacctgcct tggcctccca 65280
 aagtgtggg atgacaggcg tgagccatgg tggccagcca agaagtattt attgagcacc 65340
 55 tactatgtgc caggcactgt tctaggccct gggataaggc aatgagccaa ccaaactgaa 65400
 atctctgccc accatgagtc tactttcttt gggggagata tgggagacct ggtgagaaat 65460
 60 aagaaataaa agacttaata atatatacaa tatataataa catatgtcac acgagatagg 65520
 aatggctact agctaggaca tgcaaatgt ttgggtggga gatgtggaaa ctgagacata 65580
 65 cccaactgca gttgaatgta taactctgga gttcaggcaa gagatctcag ctggggagat 65640

ES 2 279 916 T3

atatttagaa gacatcattc attcattcat tcattcactt agtaaagtgt tattgagtat 65700
 gctctatgtg ccaagcacag tgctgggctg tggaccacac agttcctgat ccatgcgact 65760
 5 ccagtacaga tttagtgaag gttgtaatta actctgtgga aagaggagag gagatgggga 65820
 gggccccaga tgggccctgc ggaccacctaa cgtgtaagag agggcagagg agaagacctt 65880
 10 ggaaaaagag actggagcca ggtgcggtgg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag 65940
 accgaggcag gcgaatcaca agatcaagag ctcaagacca gcatggccaa catggtgaaa 66000
 15 ccccgctctc actaaaaata caaaaaaatt atccagggtgt ggtgggtggtg ggtgcctgta 66060
 atcccagcta cttgggagggc tgaggcagga gaatcgtttg aacctgggag atggaggttg 66120
 tagtgagctg agactgcgcc actgcactcc agcctgggtg atagagcaag actctgcctc 66180
 20 agaaaaaaag aaaaagagac tggacaggaa caaacagcca gtgtcagaga accaagaggg 66240
 gccgagtttc aggagtgagg gagatgctag tgccacagag tagtagggat tgaaactgag 66300
 25 acttggtctg ggtggtggag ctggcttcag tgaaagtagt ttagtagcag agtcaggccg 66360
 actctgcaca gagagggtag aggagtgggt gcagaggaag gaagtgaagc ccaagagagg 66420
 30 agacagcttt tgagcacaaag cactgtggct gggggagaga aggcgagaga gaaataggag 66480
 ccgggggtgga ggggaagcttg ggctgtttga agatggaaag acttgagtag atatgtgtgg 66540
 caatgaggaa aggccagcag agggaggcag gtgaagacac aggggagtga tgggtgtttta 66600
 35 gggteccagag ggagaagaga gctcagcctg ggagagaggg aatgaacccg catcaggaat 66660
 ggctgcatca ttggaggggc actgtgcaaa ataaaaatgc aggtcttctt attcaaaaag 66720
 40 ggctgataat ttggccaggc gcggtgggtc acgcttgtaa tcccagcact ttgggaggcc 66780
 aaggcgggcg gatcacttga gtccagcagt ttgagaccag cctggccaac atggtgaaac 66840
 45 cccgtctcta ctaaaaataa aaaattagct gggcatgggtg gctcatgcct gcaatcccag 66900
 ctacttggga ggctgaggca ggagaattgc ttgtactcgg gaggcagagg ttgcagttag 66960
 ccgagattga gccactgcac tccagcctag gggacaagag cgagactccg tctcaaaaag 67020
 50 aaaaaacaaa agggctgaga aatcaagatg gtcactcttg gttcctggat tagaagtggg 67080
 ctgagttgtg gcttctggct gcccagcaga tacctctggg gtaggaatgg ctgtcaccat 67140
 55 gctccacccc aagggtcccgt gaggtgagct actgaccttg atgatccttt gcacctgtgc 67200
 ccaggcctcc ttcaagggca gaaggcagca atggtcatgg atggtgggtg aatggggagg 67260
 60 atgagtaggg cctggtgtgc tggggacaga gcagcagggtg gccaggagcc tgtaccaggg 67320
 aagcaggcag gtggcagatg tcccaggga gcaggcagga ggtgggacct tgtgtgagct 67380
 65 gaggtccaa gccctcaatg ggtgctcctt ggtccatta aacctcccta taaaacacaa 67440

ES 2 279 916 T3

cttcagagat aaaattttta agaatttctt tttctttttt tatttttttt tgaacaaaag 67500
 5 tctcgcctctg ttgctcaggc tggagtgcag tggcacagtc ttggctcact gcaacctcca 67560
 cctccccggg tcaagtgatt ctctgcctc agcctccctg agtagctggg attacaggca 67620
 10 tgcaccacca tgcttggtta atttttgtat ttttagtaga gacggggttt caccatattg 67680
 gccaggctgg tctcaaaactc ttgacttcga gtgatccgcc caccctggcc tcccaaagtg 67740
 ctgggattac aggtgtgggc cactgcgcct ggccaagaat ttcaaaactg ggacttcaga 67800
 15 gcatgacact gaagagtagg ggtcctccga gcaggggggt acgggctgct gcttggcgca 67860
 cagctgtgga gccagcctgc cctacgtcca ctctaacaag aaaggggtgga tgccgatatg 67920
 20 gaatgggcag gaatttgga ggatcctctg gaagtgaaga ttgagtgcc aataagaggg 67980
 agaggatggg gattggggaa ggagcttgag gaagagtcga ggcctaaag ttggatgcgt 68040
 25 gaatgcacct gcacgttcat tccccattgc ttctctgaca aatttccaca agtttagtgg 68100
 cctaaaactg aaatttatga tcttgcaatt ccagaggtca gaagtctgaa actggtctca 68160
 ctgagctcaa aatcaggggtg ttaacaaggc tgtgttcatt ccagaaactc tagggaagtc 68220
 30 tgttccctga cttttccagt ttcaagtggc caccctgcatt ccttagccca tggcccttcc 68280
 ctccatcttc aaagccagca gcataatatt ttgaaatctc tctctgactt ggcttctcct 68340
 35 gcctctctca cttatgaaga tccttgggat tatattgggc ctgtctggat aattaaggat 68400
 aatctccctc tacatctcag gttcagttga ttagcaacct tgcctccatc tgtaacctta 68460
 atccccccct tgccatgtaa tgtaacatgt tcacagggtc cagggattgg gacatggaca 68520
 40 tcttgggggg ttcatattg tactactac aatttttaag gttgctttat gactgcaaaa 68580
 gaaaactcac agtgggttaa agaaaagcac acttacagtt tatttaagaa ttaagggttg 68640
 45 gtttgatcac ttgggtgatg aatcaaagcc ccaggcaggc cttctctctc tccactcca 68700
 ccatattcag aatgcctcct ttcactcca ggcttgtctc ctcatgattg caaaagcacc 68760
 50 atccaaagca gaaaggaagg tggcaaagga gccttctcct ccatgctgct ttttgattag 68820
 gaaggagaac tgctgacttg ctctgtggtt ccatggcaga gaggaaggct aggcagccca 68880
 55 gctatgttga ccaactcaag ctaaatttgc tgctagaaat caggaaatca tggatgggtg 68940
 tggaaggggg aggatgcgtg gggcctgggtg tgcccagggc agagcagcag gtggccaaga 69000
 gcctgtccca ggaaatgccg gttcctgggt gggatcacgc taagggtgggt catcagtata 69060
 60 taggagtggg ggttcagggc agccagaatc agagatcagc ctatagctgg gatcaaagat 69120
 ccatctgtgg tgagggctag gggtcagcat gtggctgggg ccagcctgca accaggatca 69180
 65 tgagtaagtc agtaacatgg gtcgggactc agttcctggc ttgagtcaga gctgttctgt 69240

ES 2 279 916 T3

ggctgaggac aggaggtgga ctgtggccag gatcagaagt cagtctgtgg ctggatcagg 69300
 5 gtcattctgt ggttggagtc agatatcata atggagttgg gatcaatcag tttagtcttc 69360
 tctgtctgtc tttctctctg catctctgtc tctctctgtc tcattctcct ttgctgtaaa 69420
 cacctgttgg aagctcagca acttgggtcc atggggaaga ggaagtga gtctgggcaa 69480
 10 ggtcctataa gtcccggtat ggaagaacat aagggaataa gagaaaatg tcaggaatat 69540
 aaagatatct cctagaaaaa tgtcaggaat ataaatatat gtatgtatga tgagaaatga 69600
 15 atgatataaa accgcaaata cgcaaacact gactctgcat gtaaacaaca cacagaagtg 69660
 gcacaaacag atacaaacac aagtgggttg aatgatggga ttgggacaat tttttgtcct 69720
 20 ggattactgt tgcctcattc tgcccttttt gtaataaagt caaattaaat ttagaatgtc 69780
 attatttctc ctaattatgt tttataccct cactccccc aaaatccaca gacatattca 69840
 gtgtaatat aaggataatg ttagcagact aggcattggtg gctcacatct gtaatcctag 69900
 25 cactttggga ggccgaggtg gatggattgc ttgaacctta ggagtctggg actagcctag 69960
 gcaacatagt gattccctgt ctctacaaaa aattaaaaaa caaattagcc aggccttagtg 70020
 30 gtgtgtgcac ctgtggtcac agctacttga gaggctgaag tgggagaatc acatgagccc 70080
 aggtgttcaa ggctgcagtg agccgggatt gggccactgc gctccagcct ggggtgacaga 70140
 35 gaaagacctt gtctcaaaaa aaaaaaaaaa agaagaagaa gaagaatgtt agcaaatact 70200
 ttttaaggcat taactatttg caggcatagt tctttttttt tgagacagag tcccattgt 70260
 tgcccaggct ggagtgcagt ggcacaatct ccgcttctgt caacctctgc ctctgggtt 70320
 40 caggcaattc tctgctca tctcccgag tagctgggat tacaggcacc cgcaccatg 70380
 tctggctgat ttttgtattt ttaatagaga cagggtttca ccatgttggc caggctggtc 70440
 45 tcaaacgctt acctcaggca atctgccac cttggcctcc catagtgtgt ggattacagg 70500
 cgtgagccac tgtgccagc cgcaggcata gttctaagga cctcacaggt actaacatat 70560
 50 ttaattctca caatagctac atgaggcaga tattataatg attcccatct tacagataac 70620
 gaatcaagca cagagaggtt acacgctggc ctggcgccac acagcatatc taatggacat 70680
 55 taggctcttt tgtctggtgc tgggggaatt tctggaaaat gcagagatgg aagagaggtg 70740
 ggatcggggc agggcggtg ggaatctcc caggccaagt tttctgggca cggcctggac 70800
 ctggagctgc tgggatggag cagggtgtga tgcctgatgtg gtcaccagag ggcagcaggg 70860
 60 accagggagc tgacttctc ttcacacccc ctccaccgg ggcgggtgcc ctgacttgtc 70920
 aataaacgtc gtggaaacag gtgggatttg gtggaagaac tgacacggtc ccgccaccat 70980
 65 cacaggcaag ttaagcttga gagcagcctg gtgtcacctg gcctccccc accacgtcat 71040

ES 2 279 916 T3

ctgctgctca cccaccact gtggcgtgca gagtactgct cttgtgtgcc ttttaccaag 71100
 5 gaggaaattt aggccagag tgggcaaaca cttttcccat ggccacacag cttggaattg 71160
 gaaaggctgg acctaacag gcaggggtgag cgcagagccc ttgttccctct gagtctctgt 71220
 tctgagctgg aaccagggaa gatgatgagc ccatgggtata tacagggcgg ttagctagga 71280
 10 ctctggtttg aagcctggct atgccactcg gtaacagcac atcgtgggca agtcccatgc 71340
 agcctcatcg gctgccggga ggatccagtg acgtcaggcc tccctcgtgg tgggagctca 71400
 15 aacacttget gggttttttg ttttttcggt gttttgcttt ttgtttttta attaataact 71460
 ttcgtgggaa aaataaagtc agaaagggtg ttcaaccgga tgttcacgga gatactacgc 71520
 20 cttcaaaaac aagcgtcat ttcgtgatcg cccacacagt gccagatgct ggggcgggga 71580
 tgggatttcc ggtggttttt cttcacttcc ctctttatat cttcaggctt tctctgaata 71640
 ggaaaaggtc tgcacgtgct gatagagtaa tcagaaaaat gcaataagcc actttttgta 71700
 25 aaaaaaaaaa aaaaattcag atgcactcac tgccttccctc ccccttttcc cctccctc 71760
 atccccaca aattctgtgt aaaggcaggg ctgagggagt acccccaaat caacatctct 71820
 30 gaaagctccc ccgcaggggc ccaggccact cagcccactc tggcgtgct acccaggggc 71880
 gtccctcct gccctctggt ccagccccgg aggctgaaac tccgcagcc ggcattctac 71940
 35 tgggcctatg acctggact tttcctactt cctgcagggg gggggccagc ctgagttggg 72000
 cccacctgat ccaccaggtc ttctcatccc tctgtagctt cccaaagccc agccagttca 72060
 gtaatagttg ctgaggccaa caacttggat ttcttttgcc taagatcctt tgttgggctc 72120
 40 ccagtcctat tgcattctta gcagtcaaat atattttcta ttgtctgctt aatttttaaa 72180
 ttagatttct ctgagacaat gctcaggcaa agtggattcg agccgacatc tgcgtaggtg 72240
 45 tcaggatgac ataagctgat atatcacggc ggctgggagc tcttaggtca gacccggggt 72300
 caaatcctgg ctccaggatt tcttagctgt gtggttctag gctaatectc aacctctctg 72360
 50 gacctgtttc cttatctgta aaattgggat aatcattgag cctcccaact agagctgttt 72420
 ggagacgtaa atgacacagt ggctggacgg cacttagcat attgcttggc cctaaacaga 72480
 55 taactatttt tatttaaaat tatattttat tataaagagc ttttggaggc aagaagtcca 72540
 gaaggctagt tcaggctctg ccattctctg ggtgactttg ggcaagtccc ttttccctc 72600
 taaaactgtt tctccatctg taaactgtgt gatttgggca gctaaagggg ttgatttttg 72660
 60 cttagaaciaa gggttttttt gttttttttt ttttttctg agacaggggc tcaactctgtc 72720
 atccaagctg gagtgcaatg gcacaatctc agctcactgc aacctccgag tcccagggtg 72780
 65 aagcaattct accaactcag cctcccaagt agctgagatt acaggcacc accaccacac 72840

ES 2 279 916 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cgggctaatt ttttattttt tggtagagat aggggtttcac catattggcc aggetgggtct 72900
 tgaactcctc acctcaagtg atacacccgc ctacgcctcc caaattgctg ggattacagc 72960
 catgagccat catgcctggc gcaaggaggt gtttctaaca aacatcaggc tgcattgtgag 73020
 gtagagagct ccccatcatt tccagtgtag tatgtaggct cctagagcag gaaggaatct 73080
 aaaatggcca agcccccaa gtgtgaaatc agggcagcta ctacagagaag caaaagtgat 73140
 acagacatag gagcttcagg ttcccagcct tcccatctaa ggcccacacc atccctctgc 73200
 ctgcctcggg tgtgaagcgc agatcactac agagagcctg ggtgatggag aactgtctctg 73260
 gattccacta tagatctgtt gctaactagc tgtgtgacct tggcagtgtg tcatcagcca 73320
 ctgttggtgt cctgttcctg tcttcttggg gtgccagagt ctctcaacac ctccaactct 73380
 cagttgaaga attttttttt tccctggagta gctggaagtg ctggagaatt aatgctcctg 73440
 gaagcagctc tcagccaatg acagatggga gctggtggac aaatacccca gctccctctc 73500
 ctttgaggc ataactgggc atgtgccatg catggtcttc cagagatccc cggcaggtaa 73560
 gcatcagtta ctcatgctgg taatctgttg aataactcac ccttttgtca gaggtttatt 73620
 taaactggag ctttgaagag gggctgggta aaatgaggct gagacttact gggctgcatt 73680
 cctgggaggt tagggcattc ttagtcatag aatgagacag gaggtcgtca ccgatacaag 73740
 tcataaagac cttgctgata aaacagggtg cagttaaagaa gatggctcta acccaccaaa 73800
 accaagatgg caacaagagt gacctctggt tgcctcact gctacactcc caacagcgcc 73860
 atgacagttt acaaatgcca tggcaacatc aggaagtac cctatatggt ctaaaaggga 73920
 ggcataataa tccacccctt gtttgaata taattaatca ataaccataa aaataggcag 73980
 ccagcaaccc tcagggctgc tctgtctacg gagtagccat tcttttatte ctttactttc 74040
 ctcatctaact tgctttcact gactctatgg actcgtctctg aattctttct tgcattgagat 74100
 tcaagaaccc tcttttgggg tctgcatctg gacccctttc aggtaacact ttcttggttt 74160
 gtgtccttcc ctgcctcagt tccccactac cttagcaggg ttccccggga ttacttecta 74220
 aatcaactat ttgaatcctt gtatggggaa cccaaacca gacggcaagt ttcttaacct 74280
 cttgcatcct ggttcctctg gatgggtgaa ttccaggagt taacagagac acagcactca 74340
 cagcagtgtc tggaggatg tttggttaat acataaaaaa taaagagaca aagaaacttt 74400
 atttatacaa aactccaccc cttctgttcc actctectca gcaaacacag ataacagggtg 74460
 atgaaactaa aacacacaga cgagcattac tcaaccecaag gtccccgct tccctagcac 74520
 ctgagggtctg ggccaacatg cagggttaact ggtgccttat gcctgctgtc tggattgccc 74580
 ggcccacagg gtggctgagc atattttatc tgggggttcc atgcatacga ggagccccc 74640

ES 2 279 916 T3

gccatacagc tgggcatggg tgtttggcag caaattgtcc ctgctttagt cacagcaatt 74700
 5 tttcatgtcc tctgttgctc cccttaactg aacacccctt gacagccggg attctgcctc 74760
 cagcatcaac ctaaggaagc tctgttaaataaat gaatgagcac ctctaggcaa tgaccacccct 74820
 10 ccctgaagtt caattttctca tctgatttccc aaggccgccc aagtcattcc ctctgatggct 74880
 gtgttagttt ctaggctcgg cttctagtcc agtgagacag aggcaggtgg gcctccatgt 74940
 gggccatgat ctggtgggca aaacatgcct tgggcagtta caacagggaac agtctgctgc 75000
 15 agaagctgtg gaggggagcag ccaacaactc gttcacaagt cgagggtgccc aaggggcctca 75060
 gttttcctgc agggggcctgc cgtggggcac ggcgaccagc tgccctctac tctcatggga 75120
 20 tgtggcgagc ccagcccaat gctggggcggg gtccagtctc tgcagccagc tgttaggcca 75180
 acgtcagtgg ggccaatcac cttcatacca tggttcttca agtcttttgg aaatctgcca 75240
 gcctggctgc cttccaggag gtggcatttc ccaggcatgg ataagcccta gtccctcatct 75300
 25 gcagactcag caacaagagg acatgcacct aagagaccct catgtatgtg ggtcccacgg 75360
 agacaaagtt cacgattttg ggggtctggc ttgagctctg agcattgcca ggggcaggat 75420
 30 ggaaggatga tgaggattta ctcttctctg agatgccga ggggtgccagg gaggccggac 75480
 acagactggc ctccagtggg accccacctg gagaggggtc tggggccctc aggggggttg 75540
 tagggggcga ggacctgtct ccacagcagc agccacagca aggactggcc atgacagggg 75600
 35 tctggccacc atctctctgg ccatgacact gtttcagggtg gccgcacagg tggcaggtaa 75660
 gggctgagta gacaatgcca ctgcccaggc tgtccacaag ggggtctgtg gcctgctcct 75720
 40 ggggaagtgg gggctttggc atgtcctcta ccttttcccc cggctccaga cccagggtgt 75780
 ctggggagct gcttgggaga tctgagctct gcggactgcg aggtggctcc ctgtccagtc 75840
 45 caaagggtgaa caaggggaca gggactgggg cagggtcccc agggcagcca ggaatgaggt 75900
 cttggaaagg cttatacccc tcttccccac tgctagcccc aaaccacat ttctctgggg 75960
 50 acacagcact gctggcaagc aggccttgaga aggccttgta accagcctct cctgggggac 76020
 ccaagcccac caccgactg gcctgggtgc caccctgtc caccgcatgt acaaactcct 76080
 55 gatagccact ggtggggggc gagacggggg ctgcagctgc cccatgctgg aggacatttc 76140
 ggcggaggat ctgtccccag gtttctggct cagggtgggg cacagtgggt ggctcagaga 76200
 gctgggggac acagggcatc tggggttcta cttcctccag gtgtctggcc agcagtgggt 76260
 60 ctggaccag ctctctggga cagggtgact ggctcagga gttgctgaag ctgcggtaag 76320
 cagggttgcc tgcgatgacg aggggcgtct ctgtgcaagt caggttgtct ggactctggg 76380
 65 tggggtggc agggaggactt ggctccaggt ggagaggctg ctccttggcc cagggaggtg 76440

ES 2 279 916 T3

cctccttggg cctgcactt gggaactcat ccagggcat gtgagcactc gtacttcccg 76500
 5 aaggtggaag aaggcatgac tccccatgt cctgctggca aaagcccca ttctctctc 76560
 cgagcaggtc caggaacagg ctctctgtta gccgggccac aatgccctcc ctccctcct 76620
 ggaagtcatc cctgctgctc tcaggcgatg cacagaagct cctttttct tctctacct 76680
 10 cctcctcctc ctccactcc accggggcct caaacaactc cacacatcg accacgctga 76740
 tgctctctgg ccagaggact gtcttgctga tctccactgg gcaccatgct gattttccag 76800
 15 agccctggaa aggcattctt ttggcagcct tgtgaggatc ttcattcctt ttcattgtgt 76860
 gctccagaaa acagggcaag agcttggtaa gacaattctt ccagtgtctg caaaagcaaa 76920
 20 ggttggtcag ggttcagttt cgacacttga aaaactccta ttcattcttc aaagcccagc 76980
 ctgaaatcac catgtcctga tggctgtcta cttcagacat gccttctaac gttataatca 77040
 gtaattgatc agtctatgtt gctagaatga gaaatccctg agggtagggg ctgtgtcttt 77100
 25 gggatttcgg gaaccagca catgtcctgg gcaccaaata caagctcaga tctgttgagt 77160
 aagaaaaagt ctttatggat gatgataatt aaaagcaaca ccattatccc aagccatgac 77220
 30 caattagaaa ggatatggaa gccgggtgcg gtggctcacg cctgtaatcc cagcacttta 77280
 ggaggctgag gagggaggat cgcttgagct caggagtttg agaacagcct gggcaacaga 77340
 35 gcccaagccg tctcaaacat ctctacaaga attaaaaaaa aggaaaatta gctgggcatg 77400
 ttggtgtatg actgtagtcc cagctactta gaaggctgag gctagagaat cacttgagcc 77460
 cagcagtttg aggctgcagt gaatcactgc actccagcct gagggacaca gcaagaccct 77520
 40 gcgtccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga tgcgggatacc tagggttgaa gcagggtcct 77580
 ggacccctt tagtttctgg agtatggaaa ggtccagcag gcccaggga agaagctaag 77640
 45 gagggcacag tggcggggca acacagcgag agcttgtctt tacaaaaact ttttttggt 77700
 ttattttttt tgagacaaga gtctcactct gtcgcccagg ctggagtga gtggcacaat 77760
 50 ctgcgctcac tgcaacctct gcctcccggg ttcaagtgat tctcatgct cagcctcctg 77820
 agtagctgga attacaggca aaaacctttt aaaatagcca ggcgtggtaa tgcacatctg 77880
 tagtatcagc tactcgggag gctaagatgg gaggatcact tgagctcagg agtttgaagg 77940
 55 tgcagtgagc tatgatcgca ccactgcaca ccagcctggg ccacagagtg agatcctgta 78000
 tattaaaaaa aaggagggga gtgttcagga tagtggtat ttgccgacaa gtatacaatt 78060
 60 aggtcaagat ttaacaaca ggcacggctg ctctggttgt taactataac agcactccca 78120
 aggggtatca ccatgtacct gacacaccag tgaaactcag ggggcttggc cagcagtcca 78180
 65 cgtttccaga acaccctcc tctgccgtc ccttgaaggc taatgtcaca gggcaattac 78240

ES 2 279 916 T3

cgaatgcagg gaagagaagg cagacatgga gctaggggct tgcctctcca attctatcac 78300
 5 cttcccaatg catgcaggct gtgacctaa gttcagataca tacggggcact tggctgggttc 78360
 ctggcctcgg gaccgcttct cccactgtga cccctaaaat acagagacag ccaatgaaag 78420
 agcagagtgg ccttgacagcc cggcctggag tacggcaatg ctcaggaagg ggtacaagcc 78480
 10 tcgacatcac acagatcaga agtccaacag gtcacttacg ctttctgagc ctcagattcc 78540
 tgggaattaa ttacattgtc ctaatattta cagggactgt ggtcgatggc aaaagtggcc 78600
 15 acagaggagt gctctgaatc tcctcccatc ccttgaatct acactggccc tgggacttgc 78660
 ttggggcccat agaattgtgat ggaagtgata tcatgccagt gctgcgccta ggcctcaaga 78720
 agccttggga cttcccaccc ttgaaaactg agccactctg taaacaagcc tggggccggcc 78780
 20 tgctggagag tgagaggcac atggctcagg cacctgcact gtcccaggta aaagtccagcc 78840
 aactaggctg ggtgcagtgg ctcaagcctg taatcccagc actttgggag gctgaggtgg 78900
 25 gtggatcatc tgatattagg agttccagac cagcctgacc aacatgaaga aaccccatct 78960
 ctattaaaaa tacaaaatta gcctggcgtg gtggcacatg cctgtaatcc cagctacttg 79020
 30 ggaggctgag gcaagaaaat tgcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat 79080
 catgccattg cactcctggg caataagagc aaaactcctg ctcagaaaaa gaaaaaaaaa 79140
 35 aaaaaagcca actgtcagac acggagggag gctacgggga cgggtcagct caattcagat 79200
 ctgcccagcc cagcccagcc cagcctcccc cgccaccctc actgctgagc ccagccccaa 79260
 atgccagcct gcagaagcat aagctaaata aagttgttgt aaccctctac atttcggggg 79320
 40 catttggttac acagcaaca ctaactgata cataaatggc acttggtatt tgcaagaggc 79380
 tggaatatgc actttatatg tattgtctca ataaattcca atatctgtcc taccaggtaa 79440
 45 acactgttat aaccacaag aggaaactga ggctcagaga attaagcaac ttgctcaagt 79500
 ccacactgcc agtgagtggc agagtcagga ttcaaagcca acactagatt ccagagtccc 79560
 50 tggaaaagca aggacctca gaccttctct tctagacagg acctataatc cccctttctc 79620
 ctacctagag aactctcatc ttgctcagcc aaacccacc cactcacca caggaccatc 79680
 gccttgggga agctgactcc acccctggct taggggtggg atacatttca ggccaatgag 79740
 55 aacccggaag ggatttgcta gtgcttcggg ggagtttcc tatgcttaag aagaagacac 79800
 agaaagcctg tcaccctctc ctctctccac tccttctggc ctctagccct ggtactggca 79860
 60 cctccccagg gaatgacaca gtgatgatga cccaagggc attctcccaa ggggagggaa 79920
 aaaaacagga aaccaacccc agagaagccc accccaggct gggattgcca aggggaaggg 79980
 65 cgggaaagcc tctgggtctg taatgacctc attcggttc tgcctctgtc tccctgcaa 80040

ES 2 279 916 T3

cccctcctgac tgtctatattg ccattccaga agccagtgaa ggtccctaac agcccaggtg 80100
 ttctgaacca cacttcttca tgtacacagt cccacatgtc ctcatccacg cctactccta 80160
 5 cctgagcadc ctggattatt atagccacga ggcggctgcg ggctgggttg ggaatctgat 80220
 cccaccattc tttcttaate ctgaaaaaca aaaggaaaag gtgttgatct ctgaattatt 80280
 10 gacaggtgaa cgctcctccc ataaaagtgg tcgttatcac caatacttat ttggcatcag 80340
 agatcagget gattagtttc tggaggtcaa accactgact catcattcta acctgggtgac 80400
 15 atggattcta ttgctaacce tattctacag atgaggagag tgaggcccaa ggaggtggag 80460
 tgacagctgg taggtggcag agccaggttc acactccgcg attctgttac ccagcacaga 80520
 20 gtctcctgagg aggccacctc tgtcctcagt gggaatgaga ccccagggga ttaggaaga 80580
 ctcaaactgc agagagagga ttctaggttc cctcaacaa tcccttttct agagcagctg 80640
 agggcaaatg accaggggaat ggctgggat ggctgggaa gctgggggac ctacggagaa 80700
 25 acacaacctt tctctcttcc tggcctgctt gggggccatgg tgcacatca ctgggaggtc 80760
 aggtcctcag accgcttctg aattagcctc tgcctatggg ttcaataaat aaacacatat 80820
 30 ttattgagca ccttctatgt ttgactcact gtgcctggcc ctgaggctac aacagtgaac 80880
 gagacaaaga tgcttgctt ggtgaaactg accttcaaga gggaaagatg gatgataaat 80940
 35 ggagacagaa atgcttata gaggccaggc atggcggtc acgctgtaa tcccagcact 81000
 ttgggaggcc aaggcaggtg tatcacctga ggtcagaagt tcgagaccag cctggccaat 81060
 atggtgaaac accgtctcta ctaaaaatgc aaaacttagc caggcatggg ggcaggcgcc 81120
 40 tgcaatccca gctactcagg aggttgaggc agggagaatcg cttgaacctg gaaggcggag 81180
 gttgcagtga gctgagatcg cgcactgca ctccagcctg ggggacaaca tgagactcca 81240
 45 tctcaaagaa aaaaaaaaaa aaacgaaaga aatgcttata tgaggctatt cattcatggt 81300
 aataagtgcc atgaataaag ataaaggggt agaagttcaa gatcagcctg ggctacataa 81360
 50 gtgacagcca gtctctacaa aatgtaagaa aattggccag gcacagtggc tcatgcctgt 81420
 acccagcacc ttgggagaaac gaggtgggtg gatcacttga ggtcaggagt tcaagaccat 81480
 cctggccaac atggtgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc tgggtgtcgt 81540
 55 ggcacacgcc tgtaatccca gctagtccgg aggctaaggc agggagaatcg cttgaacctg 81600
 ggaggcagag attgcagtga gtcgagatcg caccactgca ctctagcttg gtttttgaga 81660
 60 ctccactctg tccccaaaaa taaaataaaa tttaattaaa ataagaaaat tagccaggtg 81720
 tgggtggcaag cgctgttgt cccagctgct ctggaagttg aaatgggagg atctctttag 81780
 65 cccaggaatt ggaggctgca gtgagccgta accgcgccac tgcacttcag cctggctaac 81840

ES 2 279 916 T3

agagtgtgagac cctgtctaaa aaacagaaca aaacaagaaa ccaaagacaa agaacagcaa 81900
 5 agaggctggc atgtctgggat atagtgtatgg ggagtgggaa gaggtacagg tgatggggaa 81960
 actgaggctc agagcaaggc gatcagtcga aggttgctcg gaggcacag tgacaagata 82020
 10 tggaggggaa tttgcattcc ctgcctacct agtgtgtgtc gggccaagag tgggcacttt 82080
 catcaatcat gtttaataatc cttagccacc tctaatacctg acttagtgag gttgagcttg 82140
 ctagtcccat ttcagagatg ggaggactga ggctctgaga caccatgatt ccaagggctg 82200
 15 gcaagagctc tctggaaacg aggtctcttc caccacctcc cagccactcg ccactcatct 82260
 cctccctcag cctttactgt gatttggcct cttctggctg atgaaatatg ttctcaccat 82320
 20 cactgtcact ctgcaaagca ggaaccccg gctcaggggt ttcagcaact tgcgcccgc 82380
 cagctaccaa gctccaaggc caggattcaa acccaggtct cctgactcca tcagggcaat 82440
 cgctgcgaat tccctctggct cctaccacat gcccccaat gccccagtt gccagggcac 82500
 25 ccagtgtgtt aaggggatgt gggatgactc catcttgctt atccctggcc agctcattct 82560
 cccagtcag gggccccctc aaattttccc tccctggaga gccttatcct ggtccccctt 82620
 30 gcaaaaagca cccagaaga tctctggcct ccacctgggt ctagtgcatt cagagagtgg 82680
 gtcactatgg aaaaccacct gtttgtgatt gatatgtatt ttcagtctcc ccagtaggat 82740
 gccggtttta gaaatgtgga gtcctgggtg ggtgcagtgg ctcacacctg taatcccagc 82800
 35 actttgggag gctgaggcag gcagatcatg aggtcaggag ttcgagacca gcctgaccaa 82860
 catggtgaaa ccccatctct accaaaaata caaaaaatta gccgggcata gtggcatgag 82920
 40 cctgtaatcc cagctactct ggaggctgag gcagaagaat tgcttgaacc cgggaggcgg 82980
 aggttactgt taggcaagat tgtgccacta tactccagcc tgggtgacag agtgagactc 83040
 45 cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aagaaaaaaa gaaaaaagtg ggtccttgt cgatatgttc 83100
 tcagctctac tctcaagggtg tgtagtagct gctcagtaaa tacgtattat tgactgagag 83160
 50 gactgcaaag gggcagacta gaggggcaag tccctgccac cctgactcc agagggactg 83220
 ctgggcagca ctggggcccg gactcacttg gtgatgctga catagcaca caggcagacg 83280
 gccaggatga caatgcagga aacgctgacg ccagcagga ggtgctgctc gaagggtcc 83340
 55 ctgtaggctg gaagtgggag ggggaagccat gagctgaggt cagccatggt acagcctggg 83400
 ctccacttc caggactgga gaccaggggt caggacctc gtccgagacc ctccacgac 83460
 60 tgaccgccga cccccctcc acctcatctc cccaccactc tccctcttgc acattgagtc 83520
 ctgctcacac cgccacctc attgccccct gctcctccaa agctcagtgc cacctccaga 83580
 65 tcttaaactt gctgctcttt ctttcggaa gcacagaagt caaatgcacc aacttaggag 83640

ES 2 279 916 T3

ccggatggct ccttgctgtg tgacacagga caagtccctt atcttctctg tgcctccgca 83700
 tcctcatctg tactatgggg ttaatgacag aattgatcgt gcagggctgt tgcgaggatg 83760
 5 acatgatgaa tcaatagata atgcactcag aacagagtgg cctgtccaca tcattagctg 83820
 ccatcatctc aacacggttg acttctcctt gttcactttc atcgtcacat tctccaaaaa 83880
 10 gttttccccc acacctccc taccgttgcc ccctgcccac cgtcccatcc ccttctctg 83940
 ettttatttt cttcccagca ctactgtca tccagatcca tgtgatttct ttctttcttt 84000
 15 atatgtttgc tttttgtctc tccctccaga atgtcagctc cacaagagtg gggattttcta 84060
 tctgctttgt tcategccga tccccagtg tctagcacag ggctagccat gtaggaggaa 84120
 20 ctacagcaaat atttgctgaa ataatgaatg agggccccat acattgttat ctgtttcata 84180
 caagctagtt cccttcccc a tgccaatggc agatgagaat caattcaaaa ctttcccaag 84240
 cacctgggtc tgtgctgggt tctggagata cagccatgga gacctgcct atggagctca 84300
 25 cagcccaggg caggagacac gtggctcaac tgatatccac agtgcaggat gagcaatgct 84360
 gagagggctg tgcgggtggca gggctcagggt actgccagct gccactgcac ctaccacgtt 84420
 30 gaagaatctt ctttcattga gttttcacga cagcccttac tctcccatt atacagatgg 84480
 ggaaactgaa gcagtcttct tcaactcaaca gctttttcct ctctcccttg tcagggagcc 84540
 atgcccaccc taaggcttga gccaatcacg attatcctgt tcttttttcc aggcatttga 84600
 35 gttcccagtc ttccttgcaa tgagcaagta ataacagtaa ccatgtaaca tgtaacagtc 84660
 ttggccaatg agatgtaagg ggaattttgc tagggaagct tctagaaaga tgtttgcttc 84720
 40 ctgattaaaa aagagatgca caaggtagac tctctcgtag cagcctttcc tttccttct 84780
 gctttatgta agacagtgtg caacggccaa cctgagggca tgggtggcaa gtctaaggat 84840
 45 acaatgccac catgtgaagg acggcagaag ggaagacagc agaaggggaag agatatcact 84900
 tggctgctgt acaaaaccca gtaggtccat ttgtaagact tcattttatg tgagataatc 84960
 50 aatattttcta ctgcgaaaga cctgtgggat acctcactga aaagagtgtt ttctgggatg 85020
 taggttccaa gtgagaaagt tcccagctc ctttgtggct atgtgtagtc atgtgaccat 85080
 tttcaccaat agaatttgag aggaagtgat gcggccact tccgggctgt ctgctttcaa 85140
 55 gaagcagatg tgatctccat aatcacgctt cttctgctgg ctggatacag acaatggtgg 85200
 ggccctagag cagggtattct tcacttgggg ttgatggacc aacatggctg caggtagaat 85260
 60 tcaggggtct gagaacttgg atgggaaaga aattacatct ttactttccc taacctctca 85320
 cacctagcat ctcttccat taagaatgga ggaaggggcc aggaacactg gctcccactt 85380
 65 gtaatcccag cactttggga agccaagatg ggaagatcac tggagcccag gaggtcaaaa 85440

ES 2 279 916 T3

gcagcctggg caacatagtg ataccctgtc tctatatttatt ttaaaatttt aaaaataaaa 85500
5 taaaatacaa ttttaaaaaa agaattggagg gaagagaccc cagtaatgac agcatcagtg 85560
atcctgtccc cagcaaaaca aaactcacag ctatttctcat atcacatcac aatttcagta 85620
tcataaagta ttatttatgc ttatctactt tgaaattaca gtatttatgc gagctacccc 85680
10 tagaacttat tatttataga tcttaataaa gaagcacata tatctctaga ttaaaaatgt 85740
gtttaaatgt ttataactg catttcaata caattagttt cctctgtagt tctatatttatt 85800
15 ttatttttatt tcattgtatt tatttatttt tagagatggg ctcttgcctc gtcacccagg 85860
tgggagtaaa gtggtagcat cagggtcac tgcagcctca aactcctggg ctcaagtgat 85920
20 cctccacact cagccttccc agtacctggg actacaggtg catgccacca tgcctggcta 85980
atttttgtac agatgggggt ttactatat tgcacagggt gggattttat gtatttaaaa 86040
atattctgaa atgaggtcca taggettccac caggctgcca aaggaaacca ggacacaaaa 86100
25 gtaggtaaga atctttgtcc tggagaatga tggcaccaca agatggaaag aacctcactc 86160
cccagatttc tacagggagg gaaaccacct acaaaccagc aacattcacg ttagcttggt 86220
30 acatgagcaa gaaatatatt cctatagtgt taagccatgg aaattgtggg cttgtgtggt 86280
actgcagcct agcctgccta cctggcagat acaccacagc aggtgtatct aatggcagga 86340
35 ttgccattag aggcaccta tgatataaaa gccacagagc tcagccaggg gaagtgtctg 86400
gccacagggg aagaatggag agtggagatt accattgctt aggcctcttg atactcacag 86460
ttgtgccact tgggtgctggg gctccactca ctccagggtg tgttatagca ctgagcccag 86520
40 gccctacccc gtgccctgta ggaaatccca gacttcaggg tgctggctgc gatgcggagg 86580
gagggttcta ggtagggtcac gttatagatt ctgaactggg agagaaaagg gagatgttag 86640
45 ggcaccagcc gggggcgagg ggcaccagtg cccaccctgg ttgtgtcgt tagctgacct 86700
caccatgttt aagagccacc agcctgggta tttgggtggt cgtcctgttc aggcattgc 86760
50 ttgccacctc tgtaactgtg accaggctag agcaacatgc gtcaggctcc tcgactaatt 86820
agctgtatgt tacttaggca agttgtttaa cctttctgag ttttcgtgag ataattcaat 86880
ctcatctgta aaacaagggt aagagtccct actaccactt cctggctgtg tgaccttaag 86940
55 taagtacat aacctctctg gacctcaatg tctcatctg caaaatgaag ataataaaag 87000
tgccatctc ccttcccgca ggggtgtggt gataaggaaa tgggttaata tacgtaagta 87060
60 tttcaaatag ggtttggtat aaaaaagca ctgggtgac tttctaaagg actggcaggg 87120
tegaggcatc tctctctgtc ctctcatggg tctctagtgt ctccatggc aagtccaaac 87180
65 tcaactggcct agaatccaat gctctgccc aacctagcct tactgagaag tgacttccaa 87240

ES 2 279 916 T3

gatctattgt taagtaaaca aggggaagatg cagatgtgta tgtgttctct gcttcttttt 87300
 5 atgttttttg tttgtttgtt tgttttttaa agagagatgg ggctgggcat ggtggctcat 87360
 gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga agtgggtgga tcacttgagg tgaggagttc 87420
 aagaccagcc tggccaacat ggtgaaaetc tgtctctact aaaaatacaa aaattagctg 87480
 10 ggtgtggtgg cgggcacctg taatcccagc tactcaggag gctgaggcag aagaatcatt 87540
 tgaacctggg aggcagagat tgtggtaagc tgagatcatg ccactgcact ccagcctggg 87600
 15 tgacagagtg acgacttcgt ctcgaaaaa aaaaaaaaaa aaagagagag agagagatgg 87660
 cacagtgatc actgcagaca aacctaaagt ggcctccgatg atccccactt tgaatcacat 87720
 20 ctttgtgtca tctggctctc tctagtggtg gcaggacctg ctacttgttt ctaaccacaca 87780
 gaatatggta aagtgatgg gatatataga ggatttcatt gatgtgatta tattacagaa 87840
 gactgttaata tctacttgc taggcaagtc tctctgctt gatggctttg caaagggcac 87900
 25 atgggaagga attcaggggt aactacaacc aacagccagc acgaaactga ggctctcagt 87960
 tcaacagcct gccagggact gaatgtcacc aatattgtat gagcttagaa gtgaccttc 88020
 30 cccaattgag cctcagatga aactgcagcc ccatcccaca ccttgattat agcctcacga 88080
 gactctaaag cagagaacct ggctaagcta tgtccagact cccaaccaca gaaactatga 88140
 35 gataataaat ggggtgtgtt taaagctgtg aagctggtag taccattatt atgcagcaat 88200
 agaaaaactaa gacagcgatg actgaacaca cacatttgct tgtatagaca taagctctct 88260
 ctaaaggatg cacatgccct ctgctgccc taaccttgcc tccctttccc ttctggcaag 88320
 40 agacagacag cagtggtcag tctctgggaa gaaaaacagg aggctggagt cgggagagaa 88380
 acatgtttcc attctaagtc cttttgtacc atttgtattt ttattttgtg taactattac 88440
 45 ttttaccctc caaaaaagct ttaaaaagtg atacatgaac gctatatcca tgactgacct 88500
 tgatggcaag tgagcaacct gagttctcat cctgtcacc cctcctctgc gagatccagg 88560
 50 gctatgcacc tccctctcct ctctctcagc ccccggcagt ttcttcttgg ttactggcag 88620
 ctccatttct gcttgtggtt ggaagcacat ttggggaaaac ctggtgcaaa gtgagccaag 88680
 55 gggaggtttt ttcacaagaa agaagcaaag ttccaaaaga ttgctggagc aactacagag 88740
 agttcagaga ttttcttatt acagagggag ctgaggggtg ggtgtgagtt gtggggagac 88800
 tggggaaggg agagaaaatt ctactctct tttgtcttct tttctaaaca tgagcaaaca 88860
 60 agaagcaaca gctagatgta agttaccgaa gaaatcttac accctggaag ggagctggga 88920
 actgggaaat gttttactaa gaaacaaaag agaaatctga gcttccaaag aactacttgc 88980
 65 ggtttgtctg ttttttaaca agaaggacag gtgtttggga gaccatctct gagagaaatg 89040

ES 2 279 916 T3

tccatgggag gaaaaagagc acaggcttgg gagttcaaact actgggtgca aatctcagat 89100
 5 ctgggctgga tgcggtggct caagcctgta atcccagcac cttgggagggc tgagccaggg 89160
 ggatcacttg aagccaggag atccagacca gcccggaaca catggcgaga cctgtctgct 89220
 10 actaaaaata caaaaaatta gcctggcgtg gtggcctgtg cctgtagtcc cagctacctg 89280
 ggaggcagag gtgggagaat cactgatcc caggaagtca aggatgcagt gagccatgat 89340
 cagcccttg cattccagcc tgggtgatag agtgagactc tgtctcaaca acaacaacaa 89400
 15 caacaaaaac tcagccctgc catttccagc tgtgtgacct tgagcaatgt gcctggcaca 89460
 tagtaggcat ataaaatatg gaaaccatta tgaggcaggg attcagggct ctaactaaac 89520
 20 ttttggcttt gtttgggtgt ttatcgctac acatattccc acatccccca accccataat 89580
 cctcaaacat tccatgaatt ttcacacca taaacctttt atcatgcagt tccctctgcc 89640
 25 tgggtctaccg ttcccttctt tcccaccta gaaaactcct atgcattcct caatgcccaa 89700
 gccaaaactc cccctccact atggaacctt gcctagaaat tatctagggg aatgaatgag 89760
 tagctctagc cccaaaattc tatagtaagt tccctaatgt tctttctgga atttatccca 89820
 30 ctcatgatga gccacagttg gtgcctatag tgctgtggca gatgcaggtg gacaccgcc 89880
 cagcttttat gccatcgggt ttaggtgcc actgcttagg acagaactcc actgcctgca 89940
 35 actccagggc caacctcat tagtctaagc caattgtgcc aatcccatca cctggcctat 90000
 cattcatcag aggggagcat gtggccaagc tctggccaat cactaaatc tttatgttca 90060
 40 gctctgttct tgggaaggga gagatgggtt atctcagttg ccactgttcc acccacaaga 90120
 gaagctggac ttcattcttc tgccctagac ctggtatctg gaggcctgtg gcattcctga 90180
 gcaccaacat acccctaagc catagcccag gcattgtgac caatccaatc ccatgactgg 90240
 45 catctggtgc caggtcttaa acctggctgg catttttagc agcacagtc tgcttctct 90300
 tcccagttt cccctgggga agccactcct gccttatttt cagttcatct ggtttggatg 90360
 50 gagctgagcc cacctgcagc cctagaggca ggtatgtgac tccctccctg acaagcaggg 90420
 cccctccaca gcacctctc tccaccaca gccagtgatt ggttcagagg ctggcacagc 90480
 55 atcgaagcca ggccactgag cagcagcctt aggactctta ttagaaccgt caagaaaaaa 90540
 aaccttttcc ccactgtggc tttgggatgt aggcctggag caactagtag gcattatctg 90600
 60 cactacatga gggaagagcc tgcctaaaaa cgaagccaat acagaataaa gcagggcgca 90660
 gagctggaca ggttctctga agctggatcc agccatgctt gaaggcagat ctagaaatat 90720
 gaaaatatta aataacatat ctttggactc tgaaggtggt accttctct tccccccagc 90780
 65 ccactcctgg gactctctgt aggtcttgca caggcctggg gcattgagaag gagatttatt 90840

ES 2 279 916 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gaccaaaciaa aacttgcccc actctctagc atctgtgcac tccttcccc catgcccccc 90900
 gctttctgag cctctgctgt gtgagccaac tgccccattc ctgctcttcc cccataacctg 90960
 gcccagtgcc aaaggggaaa ccagacctga gagatataaa tcgacacccc tggcttgggc 91020
 agattgagag gaagcagtga cagacaccag catgggagct taagggtggcg ggtgcctgct 91080
 ccctgagagc caaccaggcc cagcctgggc ccttgggatg cacagagccg gccctcaciaa 91140
 acctcaagga acaaagaca gaccagtgtg tgggacagcg ggcagatggg gatctctgtg 91200
 gcctggggca ctcaagagaa agggcacatg gcttttagga cacatgtggg ccaaacaggg 91260
 gagctcatct gtatcacaca ccttgtactg tcatagccct gtgggcgggt gctcttgtca 91320
 ctctgtgtt acagatgagg aaactgaggc acaaagaggt tatgggatat gcccaacatc 91380
 acacagctgg cgagtggcac agcaggcatt ggattgcagc cctgtgggac cccaggctccc 91440
 atatgtccag agattgtccc tccaatggga atgtgaggaa ggtggattca ggggtgggaa 91500
 acatgggtgg caggaaatga cctccttga caccagcaga aaaatagggg gactcagcca 91560
 cccactgtgg acggccctg ccattactga cctgatagtt tcctgtaaat cctctcgccc 91620
 tttttaaaga tgtcaatata tgtacttaag aaggaactcc actggccagg tgcgggtggct 91680
 cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggcgagt ggatcatctg aggtcaggag 91740
 tttgagacca gcctggccaa cgagtgaaa ccccatctct actaaatata caaaaattag 91800
 ctgggcacgg tggcagggtg ctgtagtccc ggctgctcag gaggtgagg caggagaatc 91860
 gctagaacct aggaggcgga ggttgcagtg agccaagatc acgccactgt gttccacct 91920
 gggtgacaga gtgagactct gtctcaaac aaacaacaac aaaaactcca ccaacactac 91980
 tgtgaagggg atgtcaggac cagcttccat ggggaacaac caacaaactg atcttgtttt 92040
 cttgggaaag tctaagcctg ggggtgtggc tctgctctct tcattaagag gaattagtaa 92100
 acgagtcagc tgtatgggga ctctctcctt aaccggttg cctcaaaagg gaactgacac 92160
 gggtcactgt ctcttgagtc agtattattc tcttcaataa tagggttatt caagtgagct 92220
 gtcaatgtgc cacctacgat cacttgtgtc ccccaaactg ggaaacacag atgtggccca 92280
 cagccctacc ttacagagg aggagcggca tgcagagata actccccctc tctgatgtga 92340
 ggggtggggg gccaggaagc aaagggaact gcctagggca gagccagggt agaagccagg 92400
 tctctagctc ctgggatttg ctatccagcc ccagggttg cctcccaggc tcctggctcc 92460
 agggactggg cctctgctgg tcacccaccc tgttccccag aggtcacaga aaaacgtcaa 92520
 agcatgcccc ctacatctg ccgggtcggt ttactccaa atgttgactg catagggtgag 92580
 atgattatac aggtaattgt cagggggata cgggttgctc caggtcagca gcagagtgtc 92640

ES 2 279 916 T3

ggagacattg gtgtgaactg tcagggttcc tggggccctg ggtttccactg cgggagaagc 92700
 5 ggcctctatg tgaggatcta tgcaagtgact ccccatcac ccagcccagc cccggcctac 92760
 aaaccacagc caccaccagc atttttgggc gacaaaacct ccatagcata cttctggagc 92820
 accacacaga ttcagagcca tagcaagaa gattataata acaataatgt tgctaaaatt 92880
 10 ctacatagaa ctttagtggtt tattaattac cctttttttc ttcttttttg agacagggtc 92940
 ccactctgtt gccagggctg gaggcagtg gcacaatccc agctcactgc agcctcaata 93000
 15 gccaggggt caagtgatct gcctgcgctg ggctcccaa gtgctgggat tccaggcatg 93060
 agccaccgag cctgggtctt actaaccacc tttctacagt gaaggcaaag tgtatgagcc 93120
 20 aaagtaacc aaacttcagc cttttaaaaa atctttttat ttttatttat ttttattttt 93180
 ttgagacgta atctcactct gtcgcccagg ctggagggca gtagcatgat ctaagctcac 93240
 tgcaacctcc ttctcctggg tcaagccat tctctacct cagcctccca agtagctggg 93300
 25 attacaggcg cctgccacca tgccagacta attttttgta ttttttagtag agacgggggtt 93360
 ttaccatgtt gtccaggctg gtctcgaaact cctgacctcc ggtgatccgc tgggctcggc 93420
 30 ctcccaaagt gctgggatta taggcatgaa ccaccacacc cggcctcaa cttcagcttt 93480
 tacagctgca tccttcacac ctttggccac atctctgtac tttatgatga tttactgagt 93540
 35 atttttcttt attttgattc atctgtttta aaacttgggc tcctttgaag caatcatatc 93600
 catgagacct cagggtttta ttctgtgat gcatgtcata tcatgcatca ctggaataca 93660
 acgcatgttt taaactcctg tcaccacagc ccagcaagct caagggggat tcctgcaggg 93720
 40 actccgggta ccagaagaag gtcagccttc cacggtcaag accatccaaa gccgcagcag 93780
 ctgaccagt gacacagaat ggaaggaatg ttcccagttc ggttttcaat cagcagcagg 93840
 45 catgccttcc agcaagcaca cctcatctca atacgccttc ctgggcactt aagttcaggg 93900
 gtggaaacag ctgggctgaa gggggcttgg tgggtctactg cgaccagctc cgtttcaaag 93960
 50 gtgggaggac tgaggcccag gcaggggcag gaatcccatc agatttgga aaatacaggc 94020
 ggcttctctc tgctgttgct atgacccac cctctccct gccacccca cctcagccc 94080
 55 aggcagctgt gggaaacac ccagccacc ctgccgact ccgcctgct caccatgctc 94140
 gctgggcttg aaggagccct tccacagcag ctgctgcca gccacaggc ccagtgtata 94200
 gttatccgca ctgaccagt catccatgag cagggtggc acgcaccccg cgcctcgtt 94260
 60 gttctcaggg atacacgtgt gggctctgca gacacagggg ctgggttagg ctggctacct 94320
 gtaggctggc tgggcccac agctgtgtcc gggacatgcc tccaggaacc gcatcagact 94380
 65 cttccagctt cccgatcac gatgtgagga cagatctggg ggcttgggag cggccagggt 94440

ES 2 279 916 T3

gtgctggggc agccgactag ggttgccctc cttgctggcc acagcctctt accacatgca 94500
 5 ccaaggatgc tcttcacacc tgcttagctg ccggccctgg tcttgggact tagcttggtc 94560
 ctgaaagccc atgaaagggg agaaccggtg gcaactaatta atttagaaca acataagctc 94620
 10 tgcacgcac agtttggcca tcgtaagata attccaatgt tccaccttaa cagccaaccc 94680
 acatctcacg ggctaggcca ggggtctgca aactttttct gtaacaggcc agatagttaa 94740
 ttttttggac ttcaaaggcc acacaatttc cttttttttt ttttttttg gttatttgta 94800
 15 taaatttagg gggtagcagt tttttgtttt ttgtttttgt ttttttttcc tgagacaaag 94860
 tctcactgtc acccaggcta gagtacagtg atgtgatctc ggctcactgc aacctccacc 94920
 20 tcttgggctc aagcaattct ccgcctcag cctccctagt agctgggatt acagggtgtc 94980
 gccactaac ccagttaatt gttgtatttt tagtagagat ggagcttcac catgttggtc 95040
 25 aggccggtct cgaactcctg acctcaagtg atctgcccac ctcgccctcc caaagggtg 95100
 ggattacagc cgcgagccac cacagtgcc ggctttacaa gtgcaatttt gatggcaagc 95160
 ctcagatctg ttctcactgg atatgctgcc tagtggtgaa gtctgggggt ctggtgggtc 95220
 30 cgtcacccaa arggtgtaca ctatgcccac taagtaactt ctcttccttc accctctcc 95280
 caccctccca agtcttcaat gtctgttatt ccatggtaca tggataatg cccatgtgta 95340
 35 cacattattt aactcttact tataagttag aacatgcagt atttgacttt ccatttctga 95400
 attatttcaa ttaagataaa ggaggaggcc gggctcagt gctcatgct gtaatcccag 95460
 40 cactttggga cgctgaggcg ggtggatcac ctgagttcag gagttcgaga ccagcttggc 95520
 caacatgatg aaaaccggtc tctactaaaa atacgaaaaa ttagccgggt gtggtggcag 95580
 gcaccattaa tcccaactac tcgggaggct gagacaggag aatcgcttga acccgggagg 95640
 45 cagagggtgc agtgagccga gattgtgcca ctgcactcca gcctgggcaa caagagcgaa 95700
 actctgtctc aaagaaaaca aacaaacaaa caaacaaa aaaaacataa aggagggcca 95760
 50 tgcagtttct gttacaacta cagcagccag tgtgttccaa taaaacttta ttacaaaaa 95820
 caagcagtgg gccggatttg gctcacgggc catagtttgc caatccctgg actaagccaa 95880
 55 tggaaacaaa gcacagccca tctaccttag aataatcatg gaataccacc ttactggtg 95940
 aacgctgcat gctggtgtgc cgtatatccc cagtctgcc cgtaactgtg tgtcttgtgt 96000
 60 acgtgattat gtcttgggca ccagtgtaac gaagcatcct gtgcaccatg gagtagccca 96060
 ggggaaccacc tgactcctat gccatgtgtc ctggtccatc caccatcaca gaggactcca 96120
 ctctcaacac cgtactctc aatcaagggt ctagtccagt ggttctcaaa gtgtggtctg 96180
 65 ggcccaccag gtaaaactct tttcatcata atacagggac gttatttgcc tttcactct 96240

ES 2 279 916 T3

ctctcactgg cgtacagtgg aattttctag aggctacatg acctgtgatc atgtaattga 96300
 5 tctgaagatt tgttgaatgc gggcttgcat gttgttggga cttaaaattt ctccattttg 96360
 ggccggatac agcggctcac gcttgtaatc ccagcacttt gggaggcgga ggcaggagga 96420
 10 tctactggagc ccaggagttt gagagcagcc tgggcaacac agtgagacct ccatttcagt 96480
 aagaaaaaaaa atttttaatt gttttaattt tttaaaaatt acaccatttc ttcattgcaa 96540
 gttctaatta ggtaaacata gaatgatgtg ttacctacac caaagccctt tgggtcctca 96600
 15 ctcatTTTTTA agtgtgaaaa agggtcctga gaccaaaaag tgtgagaact gctggtctag 96660
 tccagtattc cagccgtatc catgtgccac gtggaccaac actcccacca tgcgctccac 96720
 20 tgtatcttac ataacatgtc cctggagatg ggacctcccc tctaacacca tataaacagc 96780
 agcaaaccat actcagcatc ctgcactcca gcgcaccacc tggaccagc tcaactcttg 96840
 25 ggcaaaccct ttgggcacaa cctcccaaaa cctccagctc cagcgcaggc ttactcggag 96900
 agcagaaaaa ccagctggta caacaggcgg agctcgggtg tgcaattggg gggaccattc 96960
 atcttccact cgcaagtaga gatgctcatg tagtcggaga cgcagggtgg ctctgcaag 97020
 30 accttcatgt tccctgggga gacacaggag cagcctgagc gggccaggaa ctcaatgcgt 97080
 gagggggact tgcacccaaa caggaccaag gggaatagca caaaagcaca gtgcaggcaa 97140
 35 agttgagggc cagcggccac agagctgggg ccaggaccag ggctgctgga gcttcccagc 97200
 tagtgtcggg atgactgtgg aagctgaaga aatacccatg ggtgcggggg ccattagaca 97260
 agaacgaacc aagtgcacct ttatctcaca caaacttgac aacttgttct tggccaaatt 97320
 40 aaagggaaaa tatgtagcag ttaaggagt gccattccat cacaccaagc ctctgccctc 97380
 gagctagggg aagtgccact tccccatttg cccactatct gcgcccctct ttgtctccac 97440
 45 ccttttctgc cctctctgtg ctcaggaggc tgataccaca gtcttcatca ccgggtaccc 97500
 ttggccttta gtttccggtt gggtttggcc aatgggagag aggagatgga tgggctggag 97560
 50 gagacatcgg ggtccttctc ctctcagcgc cctcctagct tgtcagtggc catggcagga 97620
 ctggaattgg caggatgtac actgagtttg ctaaaccacc tgagcatgag accactcagg 97680
 55 cgctccatg ctcccatgct cagtgccacg cccatctcag ctgacaacaa cttgcataag 97740
 ggcttaccat gttaaggagc tgtcttagat agcaaataaa tattccaagc ttatctcatg 97800
 tccaaaacta actcctgatt cccgcccctc cccaaagtac cttctcttct ggcatecttc 97860
 60 tgcatttcag aaatgacaac cgcgtccttc ccagtagttt aggtcagaaa tcttgagtc 97920
 atcctggcca cttctcttct tctgtcttct acctcaattc caatctgtcc tcaaactctac 97980
 65 ctcccagagg gatccggagc ctctcatctc ctccactcca gacctccctc cagacctcct 98040

ES 2 279 916 T3

ggcttccacc ctcttccctt ctcacacgg catcctgaag agtccttttg aacataatgg 98100
 5 atgatatgga tccctctgct aaacactgca aggtcttttt tgattcagcc actctgtcac 98160
 cttgctgacc ttcaactgct cctcctgctg ctcaactctc tccaccacat tccctcctgt 98220
 gctcaaccct ccgcccaggc tcagtgcagg gcctctctgc caagaatgag ccttccccag 98280
 10 acatctgcac ggttcccget tctccaagt cagctcaatg aggccttccc tgacttccct 98340
 actttcaact gcaatcccc ccactccacc cagcttcccc aacccctct tatgctgttc 98400
 15 tgtgttcttt ccccatcacc ttctcttttt ttttgacagg gtctcacttt ctcacgcagg 98460
 ctggagtgga gtggcgcgat cacagttcac tgcagccttg acctcctgag ttcaagggat 98520
 20 cctccacact cggectcctg agtagctggg gctacaggcg tgcactgcc aacctggcta 98580
 atattttatt atttgtagag acaaggctct cctatgttgc ccaagctgac ctcgaactcc 98640
 tgggctcaag cgatcctcct gcctcggcct cctgaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc 98700
 25 actgcacccg gctcccata ctttctaaca atcttttagaa tttactgata atcagggcca 98760
 cttgtcattg gctgtccct cccactgcag tgtaatctcc ataaggccag gtgacatact 98820
 30 gcaggaccct ggacgccat taatagccaa caaatgaatg attgagaagt ggtgacttac 98880
 cagagcttgc cactgcagc aggaccaggc agctcacagg gaacaggagc ccagagcaaa 98940
 35 gccaccccat tgggagatgc caaggcacct gcagagagag aggaagcagg ttagtgctga 99000
 cctgtgcttc cagcagagct catcttattc aatatgcaac cctccctgc cctggccatt 99060
 tatttgtttg tttgtttgct tgtttgtttg tttttccgag acagagtctc gctctgtctc 99120
 40 caaggctgga gtgcagtggg gcaatctcag ctcaactgca cctccacctc ccgggttcaa 99180
 gcgattcttc tgcctcagcc tcccgagtag ctgggattac aggtgccac caccacacct 99240
 45 ggctaatttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca tgttgccag gctggtcttg 99300
 aacttctgac ctcatgatct gcccctctgg tctctcgaa gtgctgggat tacaggcctg 99360
 50 agccactgcg gctgcccagc catgcccctgg ccatttgtgt ctctgccgac aacaggctct 99420
 ccacgttcac agagctctct ctataatcat gaaacaacac ccagaccac aaagtccaga 99480
 55 gggtagacta cacaacaact gtccctgggag atgcttcttg atgtggcctt ccttgacaaa 99540
 cctctacac atgtttctct gattatttcc tgagggttaa atacctgctc tgtcactgac 99600
 tagatgtgaa ccttgagcaa gctgtgcttc catgcccag tttccttacc tataaagtgg 99660
 60 gactaagaat agcccatct gattgaggtg ttgtggggat taaatgagct aacacagaca 99720
 gagccctcca acagtgaccg gaacacttta agtctcaag taacgttaca agtcagctta 99780
 65 gtccatatag gctgctataa caaaaatacc ttagagcagg taatttaca agaacagaaa 99840

ES 2 279 916 T3

cgtattgctc tattgggtgc aatgggtgtgc atctctagtc ccagctactc ggaaggtgg 99900
 5 ggtggatcac ttggagtcca ggggtttgag accagcctag ggaatatagt gagacctcat 99960
 ggtgaatttt tgaaaaattg ttttaaattt tattattcag gccagacaca gtagctcaca 100020
 10 cctgtatttc cagcactttg gggagccaag gtgggtggat cacctgaggt caggagtctg 100080
 agatcagcct ggccaacatg gagaaacccc gtctgtacta aaaatacaaa aactagccga 100140
 gtgtgggtggc gggcacctgt aattccagct actctggagg ctgaggcagg agaatcgctt 100200
 15 gaactgggggt aggcagaggt tgcagtgagt cgagatcgcg tcattgtact ccagcctggg 100260
 cgacaagagc aagactccat ctcaaaataa ataaataata aataaataaa ttttctaattg 100320
 20 catagtctctg gagactggga agtccaagat cagcacta ggagatccag atctggtgag 100380
 agcccatctc tcacggacga tgccatgctg ctgtgtcttc atatgacaga aggggcaaac 100440
 25 acacttctt cagcccgctt atgagggcac taacccatt catgaccaac cacagagccc 100500
 tcatgactta atcacttctc caaaggcccc atctcttaat atgactacaa tgggatgaag 100560
 tttcaacata tgaatttggg ggaacacatt cagcccatag caccagctat tatcattaag 100620
 30 aaaaaaatgt tcagaagcca ggtgtggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgggag 100680
 gctaaggagg gaggatggct tgagcccagg agttcaagac cagcctgggc aacagagtga 100740
 35 gaccttatct ctacaaaaat taaacaaaat cagccaggca cgggtggtgca tgccctgtaat 100800
 cctagctact tgggaggttg aggtgggaag atcgtttgag cctgggatgt caaggctgca 100860
 gtaagccaag actgtaccac tgcactccag caagacctg tcataaaaaa aaaagaaaag 100920
 40 aaaagaaaac agaaagtttg ggaggctgag gtgggcggat cacgaggtca ggagtttgag 100980
 accagcctgg ccaacatagt gaaacctgt ctctactaaa aatacaaaaa ttagccaagt 101040
 45 gtggtggcgc acacctgtag tcccagctac acgggaggcc gaggtgggag aattgcttga 101100
 acccaggagg cggaggttgc agcgagccga gaccatgcca ttgcactcca gcctgggtga 101160
 50 cagagtgaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaggaaaa gaaaaaaatg ctaagaagca 101220
 gaatctcacg gagtcaagtg tgtacttttc ccagcactc ctggtacata acgtcaaata 101280
 55 cctccaaaaa agtgtgtact ggggccgggc gtggtggctc acatctgtaa tcccagcact 101340
 ttaggagttc acaaccagcc tggccaacat ggtgaaacct gtctctacca aaaatacaaa 101400
 60 aaaaaattag cggggcggtg gtggcgctg cctgtagtcc cagctactca ggaggctgag 101460
 gcaggaaaat cgcttgagcc taggaggtgg aggtgtggt gagccgagat ggcaccactg 101520
 cactctaggg tgggcgacac agtgagacct tggtgcaaaa agagaaaaaa aaaaaaaga 101580
 65 aaaagaaaaa aagaaaacag cagcgctgg gttatatctc ctgcaacatt tcaagtggcc 101640

ES 2 279 916 T3

atccttcaact tcccgtctgg gtctctctcc tgggatotta ttcaaaaaag cagctcccag 101700
 5 gctttgtttot gctagtgagt agttctttgc cattaacagc atttctcttt tgggtgctctg 101760
 gctgtgtttc tgtggcacag gaatggttcc aaggctaacc tcacaggctt gcagcaaaca 101820
 ggaacggagg tgttgccctc gaagtactgt gtgcagtgtc tggggcatca taagaactta 101880
 10 aggccacctc aggagctcta ggcctctgct ggatgctctc cgagtgaactt gggcacactt 101940
 gaaggccctc cccccagcag ggtccacot cctctctcac ctggggccag caccatgca 102000
 15 tctacgctt gccacctaca cttctctttt ttgtttttt aacattttat ttattttat 102060
 ttcattttat ttttttgaga cagagtttca ctctgttgc ccaggctgga gtgcaatggc 102120
 gcgatctcgg ctcaactgaa cctccgctc ccaggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc 102180
 20 ttctgagtag ctgggattac aggcattggc cacacacca actaattttg tatttttagt 102240
 agagacaggg tttctccatg ctggctcagc tggctctgaa ctcccgacc caggatgatcc 102300
 25 gcttgctca gctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccactgag cccggctgcc 102360
 aactgcactt cttaaacaca ccaactcag tcccacctcc atgccttttc tctctctgtc 102420
 30 cctccacctt ggagggaact tcccttctc cctttctctt ttttttttt tttttttgag 102480
 acagagttta ctctgttacc caagctagag tgtagtggca caacctcgac tccctgcaac 102540
 35 ctccacctcc cgggctcaag caatcttccc acctcagcct cctgagtagc tgggaccaca 102600
 gatgtgcacc atgaggcctg gctaagtgtt tgtatttttg atagagatgg ggtctcatta 102660
 tgttgcccag gctggctctg aactcctgag ttcaagcgat ctgcccacct tggctctcca 102720
 40 aagtgtctggg attacaggcg tgagccactg taccggccc ttcctccctt acgctgtctt 102780
 ttctctctt cccctaattt atgatggtgc aaaatcaatg ggtgttcagt agaagcagta 102840
 45 cttggagcac ccatacgacc attctgtttt tcaactctcag tattccataa actacacaag 102900
 ctattcaaca ctttataaca aaacaggctt tgtgttagat gactttgccc aactgtaggc 102960
 50 taatgcaagt gttccgagct aagttaagct ataacgttca gtaggttagg agtatgaagt 103020
 acattttctga cttaataata ttttcaactt atgatgagtt tatggggaca aaaccccatc 103080
 55 attaagaaac atctgtgtat gagacacata aacacactca catatctcca taatgaataa 103140
 attaccccaa tacctcagtg tgcattctcag aaaaacaagg acattctctg cataatcaca 103200
 atacaaccat cgaaatcagg aaattaacag tgatgcattc ccactatctc atccacggcc 103260
 60 cctatttatg ttttgctaatt tgcccaata atgcccctta tacgtccagg atgcaatcca 103320
 agatcattca tcacatttga ttatcatgcc ttctagtga ccaggctctg gcttctaaat 103380
 65 actattctgt actgaaagga accagagcgc cttagagaaa tagctgatcc caggagaagg 103440

ES 2 279 916 T3

5 aaaagtacca gataggcttg gaattcttgt gccagacaat aaggaagtac tcagcagcta 103500
 gectgacctg gacaaaacag gcacattttg agcatcaaaa tgaatattat ggtatccact 103560
 tgtaaccctt ggagctaaag tccaggagtc tgtattgaca tagatcaata aatggaggag 103620
 10 gccgggtgca gtgtggtgtg tgctgtaat cccaacttct tgggaggctg aggcaggagg 103680
 atggcttgag cctgggagtc ggaggctgca gtgagctatg atcgcaccac cgcactccag 103740
 cctgggcaac agagtcagac ttcatctcta ataaataaat aaacagggaa gaagggaaag 103800
 15 ctctatttta ctatgacagc ctcaaagtaa ctccctgcaa aacttgtatt gtatattaac 103860
 taatgagtga aaatacatat caatgaacgt tacaatacag aaacctggca gacaccacct 103920
 20 tcaccaagtg atctaaactc accaacaaga atgggacaaa tccccaacat cacctccctg 103980
 aaacaattcc tgagaagagc acagcatgtc ttttcttggg ttcttgccaa ggatgcatac 104040
 atcatttgga aacgtcagac aaatgtacac caagggccag tctatataca agaactggcc 104100
 25 gctgtctctc acgaagtgcc gggggtgcaa aggacaagcc agcgtgggac atctgtccct 104160
 ttttaaattg tctgtcatcc tgacagccag ggtctgtccc attcactgcc gagtccccag 104220
 30 tatctacaac ggtgcctggc acataggacg tgttcagtaa ctgtttgttg attaaattca 104280
 ttttgacat gatgtggggc ccttaactgg ctacgcatga ggctgcaaag ctctctctag 104340
 35 gggaaggctc tgtatcggct caaagggtga actcgtcttc cttgctgaga gttacaaaag 104400
 taaagtctca agtaaaggag gggcggaat ggggtgtgtg gttcctgaca ctgatttctc 104460
 40 tggcaagtcc tagtaacttt tactctcaca actacacaga tgcccacagt atcctgtggc 104520
 agagatggca aaggtgtcac tttagcctca attatgaata aagagaaaca gagaggccaa 104580
 gacgcctgtc caaagtcaca cagcagaaga ctttcatggt aaagtccctc agggaaacag 104640
 45 gggagtcaac aacctgtca agattcacta aaacatccca gcatggcgtc aggattgata 104700
 tccttaatct gttgtggaag gcacgccag acttacgcat gcccatgtgc acacacacgt 104760
 50 gccgcagcta gcttctcagg gatgtgtggg tgctacattt caggagagat cacagatgca 104820
 gtgggagaag aggttccct gaacatcaga ggcaaaaaga acaaagatgc aggtgagtaa 104880
 55 aagaattaaa aagataagtg ccaggttatc gcgttcaagt acacggcaag aggagatgat 104940
 ttcaagttcc cattctaat caagagactc ctggctgggc gcggtggctc acgcctgtaa 105000
 60 tcccagcact tcgggagget gaggcaggca gatcatgagg tcaggagatc gagaccatcc 105060
 tggctaacat ggtgaaactc agtctctact aaaaatacaa aaaattagct gggcggtgtg 105120
 gcgggtgctt gtagtcccag ctactcagga ggctgaggca ggagaatggc ttgaaccggg 105180
 65 gaggcggaagc ttgcagttag ccaagattga gccactgcac tccagcctgg gtgacagagc 105240

ES 2 279 916 T3

aagactgtct cagaaaaaaaa aaaaagagat tcctgaagtg gtggagttgg aaggggtctc 105300
 5 agcggtcacc tgccaagctc aactgccaac ctggacaagg atgtcctgcg aacaccccac 105360
 ttctgacatg ctgctaggca gtttcagccc atatgccacc acagatggag caatcactct 105420
 10 caggtctcag ttaagcagag ccattggaaa cagcctcctt atgttgagtc aaggctttgt 105480
 gtgaacaaaa tccctgcttg ccagcactt accttgctact tgacactttg ctaggtgctt 105540
 tagaagtatt acctcaccga atccacacaa gaatcctgaa aggtaggctg ttatcccaac 105600
 15 tgtctagcta aggaaactga ggccagagag gccaaataac ccatccacca ggtcccacag 105660
 ctggtaaaag gtcagagcta gaatcagaac ccaegtttgt ttgcttccga gcccaccgtg 105720
 20 gattccagta taccagttcc ttcaatctca tctcctaaaa ctgcaggctg aaccaataa 105780
 gatgaaataa aatgagccgg gcagagttgg ccatcctgct tgtcaatttc aaacaacagt 105840
 25 tccgcaagtg taggataaga aaatctgact gagcagcaga aaagtccctga ggattttatc 105900
 atctgcaaaa tctccaaaag ccaatggtga agcagcaact taaaaaaaaa aaaagagtca 105960
 cccgaggtca tattaacaga ggtatccatt tatagactgt tacatctcac aacagcagaa 106020
 30 tatacattct cctcaggttc atgtggaata atcaccaaga cagaccacat tctgggacat 106080
 aaaacaacct taagagattg aaaacattag aaatcacaca acatatgctc ttaggccaca 106140
 35 atggattcaa attagaagtc actagcagga agaaagccag aaaatttcca agtatttgga 106200
 gatttaaaaa cacacttccg aataacatat ggatcaaaga agaaatcaca agagaaacta 106260
 40 aaaatatatt taactaaata aaaatgaaaa tatagcctat caaaatcggg gagacgtagc 106320
 aaaagcagtg cttagagggg aatttatatt attgaatgta tatcttagaa agaaagtctc 106380
 45 aaaatcaata atctgtttcc atctagagta ctagaaacag aaaagcaata tatgtctaaa 106440
 acaagcagaa gaaaaaaata caaaattgga gcatacatca atgaaattaa aaatagaaaa 106500
 ttaatcgagg aaaatcaatg aaatcaaaaa ttggttcttc gaaaagatca atgaaattga 106560
 50 taaatctcta cctaggcgaa tcaaaaaaat gagagagaag gcactaatta ataataatgt 106620
 gatatggcct ggctctgtgt cccaccccaa atctcacctt gaattgtaat atgaattgta 106680
 55 atccccacgt gttgggggaa ggacctcatg ggaggtgatt agattacggg agcagttccc 106740
 ccatgctgtt ttcgtgacag tgagtgagtt ctctgagat ctgatggttt tataaagggc 106800
 60 tttccccccc tttccttggc gtgtctcctt cctgacgtca tgtgaaaaag gatgtctttg 106860
 ctcccccttc cgccatgata atatgtttcc tgaagcctcc ccagccctgc agaactgtga 106920
 gtcaaacctc tttcctttat aaattacca gtcttgggca tgtccttaga gcagcatgag 106980
 65 aacaaactaa tactattgta aattaaagaa aagttattag aggtggcaca tgccctgtagc 107040

ES 2 279 916 T3

5 cccagctact gggaaggctg aggcaggagg atcacttgag cccaggaggt taaggctgca 107100
 gtgggctgtg ttcattgccac tgaactccag cctgggcaac agagaaagat cctgtctcaa 107160
 aaaataaaaa ataaaaat taaattaaaa aaaagtggca ctatataatg attcgggagt 107220
 10 taattctcca agaagatgta aataacaatc cttaatgtgt aggcaactaa caacaaaggg 107280
 tcaaaatatg taaggcaaaa actgagagca gcaaggagaa atagagaaat ctgtgtgatt 107340
 attctgaata atactattat tggataataa tagtattatt actattactt caactctttt 107400
 15 ggtaatcgac agatccagca ggcagaaatc agtaaggaca cagttgactt gaacagtgtc 107460
 gtcaatcaac tggatctaag tgcagtgtgc aaccacaact tggcatccct ttggaaggaa 107520
 20 tactgtgtgc atgtatgaca acaaccaaca cagagagggc ctgataatcc caggaggcct 107580
 agaaagtctt tacctggaaa gctctgccct cctatactgg gcagcctcac cattcactta 107640
 25 aacacacaga gtttaccaca tgccaagttt tcttttacat cttttacata caagaatgca 107700
 ttttaataatc tatgaaatag gtaatattat tttctccatt ttcagatgag gaaaccaagg 107760
 cacagaaagg ctgagtgtgatt tgtctgaggt tgcacagctg tgacagtcac gggctcttaa 107820
 30 tccagcactc aagctccaaa gctttgggtc ttaactacta tctgtctaga agtcagagac 107880
 cttagtgttt tggggatcaa tgacctatct gagcatctaa tgtaaaccac aaacctgtt 107940
 35 tctggcaagg tgcatacact taattctgca ttcattttta ggggttcaca gaatccctga 108000
 agcccaagtg aggacctcag gtcaaaggcc tgtcctctaa gcagtgggca gcttttgagg 108060
 40 gtctttgagc aggggagtggt caaatttttg agaagctctg ggggatgtgg gcagtttagca 108120
 gttgtgcag atgaggtc caactgctct tctccacatc acagccagag ccatttttaa 108180
 atcagaaatg agaccagggc cagctcacac atccaatgcc cctgggtcc taaagggtt 108240
 45 cttcacaggg gccacagatc cccagggggt tcacagctca ttagagaagc atctctgact 108300
 tagaataaaa tccaagccct agagtga aaaagccagttc ccagagtaca caccctgtga 108360
 50 ctccatttat gtaacatact tgaaatcaca taaccatgga aatggaaaac acatcagtgg 108420
 gtgccagggg ctgagggggt gggtcaggaa gggagttgga tgtggctata aaaggagaat 108480
 55 ttgagccatc cttgtgatga tagaactgtg ctggatcctg gctgcataca caaacctatg 108540
 ccgtgataaa attgcatagc actaaaccac acatgcgtac gcaaacacaa aaatgagtac 108600
 aagtaaatcg ggaaatccca ataaggtcag tagcttatat cagtgtcagt atcccagctg 108660
 60 tgatactgta ttacagattt ctacaatctt gccctcgggg ggaacagcat agaagcaggg 108720
 gtctctctgt gatttctttt tcttttctt tctttttttt ttttttgag atggagtctc 108780
 65 actctgttgc ccaggctgga gtgcagtggg gtgatctcgg ctactgcaa cctctacctc 108840

ES 2 279 916 T3

ctaggctcaa gtgattctcc tgcctcagcc tccccagtag ctgggaactac aggcaagcca 108900
 5 ccatgcccaa ctaatTTTTg tatttttagt agagatgggg tttcatcata ctgaccaggc 108960
 tggctctgaa ctctgatct caagtgatct gccgcctca gcctccaaaa gtgctgggat 109020
 tataggcatg agccaccacg cccggcttct ctatgatttc ttccagctgt gtgtaaatct 109080
 10 ttaattatct gaaaataaaa agtttaattt aagaaaatga agaaaagagc caattccctt 109140
 gcttatccct ctaacattcc cctcctatcc cctctccctc ttctgcaatc ctccattggc 109200
 15 ctcagccctg ggatacactc ccagctctcc cttttccaag catttgacc agaaacactt 109260
 cagaagcctt ctctgacccc cctcaactaa tgcgggccct ccctgtgact tcttatcaca 109320
 gcaccctgtt tatgtctgtc ccagtactta tcactatctc taatcagatt aatgaggtta 109380
 catgtatgaa tgtttatttt atttcaagat gcagatagca aagatagctt tgactgcaaa 109440
 atgttttcaa cttccctaga tttttttttt tttttttgag acggagggtt gctctgttcc 109500
 25 ccaagctgga gagcagtggc gtgatgtcgg ctcaactgaa cctccacctc cggggttcaa 109560
 gcgattcttg tgtctcagcc tctcgagtag ctggaattac aggtgtgtgc caccacccc 109620
 30 aactaatttt ctgtgttttt agtagagaca ggggttcccc atgttgcca ggctggcttt 109680
 aaactcctga cctcaagtga tccacccgcc ttggcctcca aagtgtctggg attacaggca 109740
 35 tgagccactg tgtctggcct agattaaaa atgccataag aaaaagacag aactcaagtg 109800
 tgttagtcca tttttgcatt gctataaaga aatatctgag actgagtaat ttacaaagaa 109860
 aagaggttta attggcttat ggctctgcag gctgtacagg aagcatagca cccgtatcta 109920
 40 cttggcttct ggggaggcct caggagctt ttattcacgg ggaaggcaag aggggagcag 109980
 gcgtacatgg tgacagccag ggcaagagag aggagggagg tgccgcacac ttctaataaa 110040
 45 ccagatcttg tgagaactca ctactatgg caaggacaga accaaacct gagggacccg 110100
 tcccctgac ccaacatctc ccaccaggac ccacctcaa cactggggat cacatttcaa 110160
 50 caagagattt agagaggatg acatcccaac tatatcagca agcaaaagac tagaaaaagg 110220
 tagcaatcta cattatgaac ggttaatggc cttaatatat gaagagttct tacaatatca 110280
 taagacaaac atccctttta gaaaaatagg caaagaacat aaatggttca caaaagacat 110340
 55 attcctccat cagatgtgaa atagccacct caatatactg ctagttttc aagtggggag 110400
 tataataggt aacctcaa ataaattatg tatttgtcta taaatgcatt gtttgccctc 110460
 60 ctctgagaga ccacaagccc catgagggca gagctttatg tctgctgtgc tcaactgctt 110520
 atccccagtg cctgaaacag tgctgacac agycatagca tgtgtacaat aaacatatat 110580
 65 taaatgaatg aatggtttaa aagtcagcaa taataggctg ggcacagtgg ctcacgcctg 110640

ES 2 279 916 T3

taatcccagc actttgggag gccgaggcag gtggatcacc tgaggtcagg agttcaccaa 110700
 5 catggtgaaa ccacatctct acaaaaatac aaaaattagc cgggcatgat ggtgggtgcc 110760
 tgtattccca gctactcggg aggctgagag gctgaggcag gagaatcgct tgaacccaag 110820
 aggcagaggg tgcaatgagt tgagatcaca ccattgcact ccagcccggg caatagagca 110880
 10 aagttctgtc tcaaaaaaaaa aaaaattcag caataataaa ttcaacaatc tttttttttt 110940
 ttttttttga gatggagcct agctttgtca ccagtctgga gtgcagtggc acgatatcag 111000
 15 ctactgcaa cctccgcgtg ggttcaagtg attctcctgc ctacgectcc tgagtagctg 111060
 ggactacagg agcacgccat cacacctggc taatttttgt atttttagta gaaacgggat 111120
 20 ttcaccatgt tggccaggat ggtctcgatc tcttgacctc ctgacccgcc tgccctagcc 111180
 tcccatagtg ctgggattac aggcattgagc taccgcacct ggcccaata atcattttta 111240
 aacatgaacc aggtcccaag cttttgtcca tagttaactg tatatgcagt acttattttg 111300
 25 tgccctggcc tgttctaagt acctacaata tattaatcaa tttggttctc ccaacgacct 111360
 tatgaggtag gtgccattaa cattcccatt ttactgatga gaagactgag gcacaaaaag 111420
 30 gctagagcac ttgctggtgg tcacagaacc ataacctagg cattgtcact ccaaaatcca 111480
 cgtgtttaag gactgtggtt gctgacctt gaaatgcagt ccccaaaacc ctggaacttt 111540
 35 gtccggggag cccactggc ctgagacca ttggcctgag acccagagac agcaagtgc 111600
 aaggccaagg tcacagagtt aggaagcagc aaagtcagtg aaggccgcag ccaggaaatg 111660
 agcagaagca tgggcctggg aaaacacgcc cgccaccagg agaacacact tgactcactt 111720
 40 tttttaaaaa actcggggga gattaagtga ttaagcctg aaatgtcaga agccagcagc 111780
 agcctggaag cgaccagca ggactcttcc cgaaccacaca gcgggtggca ggggggcagg 111840
 45 gggcgaggga ctgggggcgc acagggggcg gtacaggcct tctgctcttc tccctctgg 111900
 gcaggaaacc tggcttgag gaggggctgg ttctgcagac aggatgcaag cacctctgtg 111960
 50 acaggtggca tgtggagagg aatccaggga cagcaggggc ctcggtggg ggctggggct 112020
 ttggagccgc tgaccctga aactccacga cagaaactgg cctgaaacct cagctcctgt 112080
 55 ggcgcaatca gttagtcag ctacttataa gaaaccagcc cagagcttcc tctggcttct 112140
 gggacagctg ggctgggctg gcaggaaagt aggcattgac ttcttctgg gacagtaacc 112200
 tacctagaac tggggtttcc agaaatggca gccacgtcgg tggccctact gggatagtaa 112260
 60 ggcaggccag gccagggccc cagaatggcc cgggattctgc ctggttggt ccgtccccag 112320
 cccagccagt gggagggagg ggaggcaaca gactggctct gcagccacca ggaacacaaa 112380
 65 tcggccctct ccaccaacag caccaccag cctccctgtg ggctgctgt ggctcaacca 112440

ES 2 279 916 T3

tcctcaccca cttgctcaag tacctcactt attctccttc tcttttttgc tttagagaca 112500
 gggctctcatt ctgtggctag aatgcagtcg caccgtcacg gctcagtgca gccttgaact 112560
 5 cctgggctca agtgatcctc ctgccttagc ctcccaagta gttgtgacta caggcacaca 112620
 ccaccatgct cgaataattt ttaaattttt gtagagatgg ggatctctct ctgtggccca 112680
 10 agctggagtg ctatggcaca atcatagctc actgcaacct caaactcctg gcctcaagca 112740
 aacctcctgc ctgggccttc caacatgcta caggcatgag ctgccgtgtc cagccatctc 112800
 15 ctcatattt cttgctgtgg gtgttttcca agtactgcct atgtgctggc tattacagat 112860
 gcaaacaggc cattcattca ttcattcctt tcttctttta acaaatttt gagcaaggaa 112920
 20 gaagttgcca gagcgttttg agcaaagaag tgacatgatg agactttaaa aaagacctct 112980
 cttgcttggg tgggtggggc acgggtagaa gtgggtagca gtgaggaggc taccacactg 113040
 gccccagaga gaggtgccag ggctcacacc aggctgcgga gatggggagg ttgagaaggg 113100
 25 gctgaattct agatctgtgt tgaagacaga gccacagga tttgctgaca ggatggatgc 113160
 tgtggggcgg gagagagaac aggaaggcta ataggagtca agaattgatt cacagccatt 113220
 30 ggccttttcc aagatggcgg cctgtggggg tagcccgtgt gacaagccag cctgctgggc 113280
 aagctgcagg acttcagatt agcagaggag gctgttagca ggcgtcagg gaagacctc 113340
 35 cctcatccta gagggtcagg tttctttatc ggggatgcac cagagtctc tcggggaggg 113400
 gcccagacata cagcaggcac tcaataagt agcatgtgta ttttatttta ttcttatttt 113460
 aacaggtata cagtgtttcc ttggtgccag acactggcct aggtgcttta agccctccct 113520
 40 atgagataag tataattatt aaaccattt tatgattctg aaggttctt tttttttttt 113580
 gagacagagt ctactgtgt agtcaggct ggagtgcaat ggtgggatct cagttcactg 113640
 45 caacctctgt ctcccagggt caagtagttc tcctgcctca gtctcccgag tagctgggac 113700
 tacagggtgc cacaacaacg cccagctaatt ttttttgtat ttttagcaga cacagggttt 113760
 50 tgccatgttg gccaaagctg tctcaaactc ctgacctcag gtgatccacc cacctcagcc 113820
 tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc cactgcgtct ggcagattct gaaggttctt 113880
 atgagagggc ggggtgaggg agggaatgag ggaagaccca gcgaataggc aggcaggagg 113940
 55 gagggcacgg ccacttccc accctacaag cggggccctt ggctggagca agggggagaa 114000
 ggactggctg ggatggcagc tggaaaggtg gcaggccagg gacaacatcg tctgccaagc 114060
 60 catggcagta gactcaact ctgtctctag ggcagtgggg agccagtga ggcctctaag 114120
 caggagagga gcgggctgag ctgagagctg gcgaagaggg ggcaggtttg agcctgtttg 114180
 65 ggaggaggag gcagcagga cttggtggcg cttggtgggg aaagcaggct ggggagagcg 114240

ES 2 279 916 T3

5 gggacagagg gaaagtggcc tcaggctggg gtggtgggga ggatcccagg gacccttccc 114300
 acgatggaga gccgagaaga gaagcagatt tgctggggaa gaccacgcgc tccggcgcac 114360
 tgtggacact ttgagtcac acagteaaca ggcaactcca tccgggatcc tggaagccag 114420
 10 gectgtcttc agaagattcc agaggcccaa aggaggaaac agagcctgag gaaactgtgt 114480
 ccagaagcca cctaccagg aacagcagcc agcctggcct ccatctttct gcaacctgtt 114540
 atcttgcttt atttctctgc aatctttgtg gcatattgca cactcgggccc ttatgtgttt 114600
 15 ggtgctcata tccctactg caaggccagc tcacacaagg ccagtgtcga tcccgctcac 114660
 agccatctcc ccagagccta gcacgggtgcc tggcacacag cagggtgctcc atgaatatct 114720
 20 gctgaatgga agaacgacag gatgaattcc cctggctgtg agcagggagg cctggttggt 114780
 catccccaat tttccacctc tccctgctgg gcaaactacta gcaaactctg gcttgagtc 114840
 25 cccttaaattg tccaatgca ggcacagatc tcagcccacc tcggggccct gacctccaga 114900
 gagctgggta tcgactatca ctcaactgtcc tgagcagcgg acaatggcct cttggcgcca 114960
 ggggtgctgat tagattttga ctgtcttagt gacagctatg gctcctagct ggctccttc 115020
 30 ttgaggtctg cagaggtcac tgtgactggc cactgtccc ctcttccttc agccatgaga 115080
 ggccatgccc tgggcccctc tgccttgggt ttgcccctc cccaactggg tgcaactttg 115140
 35 ctcaccagcc ttggcattgg ttgtaccagt ctactaaca aaaaaagca cttgaaggct 115200
 gggcgcggtg gctcctacct gtaatcacag ccatttggga ggctgaggca ggtagatcac 115260
 40 ttgagtcag gagttcaaga ccagcctggg taacatggca agaccccgtc tctacaaaa 115320
 atacaaaaaa aaattgccag gcatgggtggc acatgcctgt agtcccagct actaaggag 115380
 atgaggcagg aggatggctt gagcccacga ggctgcagct gcagtgaact gtgatcatgc 115440
 45 cactgcactc cagcctgggc aacagagtga gacctatct ctaaaaaaaa aaaaagaagc 115500
 ccttgagcct cactcactca cttaaccatg gacccaatcc aaggagcatt gcagatacaa 115560
 50 ttaatatcat ctccattgca gagatggaga agccgaggcc cagagagggg caggaacctg 115620
 cctaaggatg cacagctagt gagtgggctg ggatttgaac ccaggccttt ggctctggag 115680
 55 tgcacagcac agtgccctggc acagaagcag tcataaactt gcttttttat acaccactct 115740
 tttttgcttc tccgggaaag ctactatgg aagatacagt aaaatattct cctgcaagc 115800
 60 acagatggag gaatgaggct gagggagggt cagaatttgc ccgagggtgat ggtgacggag 115860
 caggaagtaa ccaggtagga atttagaate tggcctttgt caccatttgc tcggccctca 115920
 gcagcagtga acttgtctca acaatgacca ggactttgcc cctggggcaa acccaaagcc 115980
 65 aggacaacac atgggcacag gtaagagctt cccgttcatt ttctgcttgc agactggcat 116040

ES 2 279 916 T3

atggaaggca gtgggtgggg actacccatg gagctcttcc tgttgtctca ccccatacca 116100
 5 ttcctggatg ggtggggaca cacagacatg ggggccacct ttgtgggcag ggacccccaa 116160
 gcatctgaga cacagaagca taactctggg cctaagtga ggctccaacc tgactcgggtg 116220
 10 ggagaccgtg gcaggctgga gtccactcag agcctcagtc tctcatctg tgaaatgaga 116280
 ataagatcac ttgcttcatg gctggttgca aggctgctgt tgtttttaac tcatctggct 116340
 tattagtaca ggagtactga catcaataaa atagaattca tgacaatgat gtcttgagta 116400
 15 agtattagaa gagagaaggt ggatggtttt tttgtttttg tttttttgag aatgtctcac 116460
 tctgtcacct agactggagt gcagtggagc aatcatagct cactgcggcc ttgaattcct 116520
 20 ggtctcaagt gattctccca cctcgccctc ccaagtagct ggaactacag gtgcacgcca 116580
 ccacaccag ctaattttta gtttttggtg gagatgggtg ctcactatgc tgcccaggct 116640
 25 ggaagttggc tcttttatac tgattaaagg aacaattcag ccagctgcgg tggctcatgc 116700
 ctgtaatccc agcactttgg gaggtgagg tgggcagact gcttgaacct aggagtttga 116760
 gactggcccg ggaacatag cgaaatccca tctctacaaa aaacacaaac atcagctagg 116820
 30 cgtggtagtg cacatctgta gtcccagcta ctcgggaaaa tgcaacaatt caccaaaaaag 116880
 gtataaaaat cctgaacctt tattctactc atatggctat gcacttaaca acatagcttc 116940
 35 aaaaataaag caaaaaactg acagactcaa aaggagaact taacaaagcc tctattatgg 117000
 tgaattgtaa ttgtattacg gtgggaggta aatcaggtaa aaaaaaaaaa aaccacatag 117060
 tgacataaca aatatagata atataatagc tagcttgatc aaatagatac atttctagaa 117120
 40 ccttataccc aacagaaaat atacattctt ttcaaacaca agaggaaaaa aatgaccaga 117180
 aaatectata aagatctcag caaattctct accactgata ttataggaac cacatatatt 117240
 45 gaccacaaca accatgatga ccaaatttag aaatcaaca taaaaagata acttaaaaaa 117300
 ttctatctgt ctcaaaaatt taaaaagcat ataattaaat aagtcttaaa atgggaacca 117360
 50 aaagggaaat tctaaactgg gcagtgaata acattgtgta acaagttgtg gaaagaaacc 117420
 aaagcagtac tcaagaaaa aatgatagca tgttagcctg aagtagattt attagagagc 117480
 55 atgaaaaact ggaacctctt agcttlagac aaggactctc agaatagaag aaacttggat 117540
 taacagcagc tcatatagaa gagaaacatg gagattttag ctgacaagcc caatatgcac 117600
 60 tccaagtggg atatggctgc tacacagtat gatccaggt tgcacaaaca gaagtataag 117660
 ctctagatcc aaggaggtaa tagtctcctt cctctttgac caaacaacaa gtctttgcgt 117720
 gggactccaa ccagttgact catgtgccaa ggcaggccaa acttataatt tcttgagtca 117780
 65 gggagaatac ctgaaataac tacagttgtg tagtctgaat aagagaagta tccgagtttg 117840

ES 2 279 916 T3

gagggagatg gtcactacct ccaagaggca gaaacagact cagaaagtgg aagctcctag 117900
 5 aaagctaatt tgggctgggc acggtggctc acacctgtaa taccagcact ttgggaggct 117960
 gaggtgggcg gatcaccccta ggtcaggagt ttgagaccag tctggccage atggtgaaac 118020
 10 cccattgcta ataaaaatac aaaaattagc caggcgtggt ggtgtgtgcc tgaaatccca 118080
 gctactcggg aggttgaggc aggagaatca cttgaaccgc ggaggcagag attgcagtga 118140
 gccgagattg cgcactgca ctccagcctg ggcagcagag tgagactcca tctcaaaaaa 118200
 15 aaaaaaaga aagaaagaaa gctaatttgg ctaaactctca ggaagatttt ctcccagtta 118260
 gagctgcccc cctgtggaaa tgtggcttct ggaagaaata tgctagagge aagaccgtcg 118320
 20 ggaggtgtg gccctgccag cttggagacc tgcccagccc agagagctgg tgcctctcct 118380
 ccctagaatt cagtcttccc ttttaaaaag gcagaatact tccctggccg cttcaggaaa 118440
 acataggcct tctctgagtt tttcaaaaat ggttctgggc gactatgctc actgatttcc 118500
 25 aaccaagaaa tgtaatcctt ttaaactctc ctctttgggc tggatagctc agaaccgtgg 118560
 ttaaattgcac aggccttctgg gtccgtagcc ctgggtttga atctggactc tgccacttag 118620
 30 gagccgtgtc acccaggtaa gtctctagcc tgagcctcag gttcctcctc agggaaatga 118680
 gcaggacacc cactcatctc cattcctgca ccagcacag agcgtgatgt ggactccagc 118740
 35 ctccactgcc agaggccgtg gttggggcca tggcttcggg atgattcaag cacattacat 118800
 gtattacgta ctttatttct attattatta tatggtaaca tataatgaaa taattataca 118860
 actcaccata atgcagaatc agtgggagcc ctgagcttat tttcctgcaa ttagatggtc 118920
 40 ccatecaagg gcgatgggag acagtgacag atcatcaggc attagagtct cataagaagc 118980
 acgcacccag ggccgcgtgc agtggctcat gcctgtaatc ccagcacttt gggagactga 119040
 45 ggcaggtgga tcacctgagg ccaggagttc gacaccagcc tggccaacac agtgaaacce 119100
 tgtctctact aaaaatacaa aaattagctg ggtgtgatag cacaggcctg taatcccagc 119160
 50 caccaggctg aggcaggaga atcacttgaa catggggagg tggagattgc agtgagccaa 119220
 gatcgacca ttgcactcca gtctgggcga caagagcgaa actccgtctt aaaaaaaaaa 119280
 gaaaaagtac gcaaccaga tccctcacat gtgcagttca caaaagggtt tgtgctcctg 119340
 55 tgagaatcat ctaatgcctc agctgacctg acaggtggcc gagcttgggt ggtaatgcga 119400
 gcgatgggga gcagctgtaa atacagataa aacttcgctc actcacctgc cactcacctc 119460
 60 ctgctgtgtg gccctgctgt gtggggaccc ctggtctgag aactgagga aggtgctcat 119520
 tcataaaata atatgtaaaa tgattggact gtctgtaaaa tggggcttgg aggaaccagt 119580
 65 cctgcgctgc ccacattcac agtatttctg ggcagatgga tggcaggag tacaccgaca 119640

ES 2 279 916 T3

atgtaaaaaa gtggatcgat ctaaattggca ggtgtgtctt cagcactcag gcatagattt 119700
 tatttgtgtt aaacaccatg gtgaggactg aggactctgg agcttctagg ttcacagccc 119760
 5 tgctctgcca ccttcagggtg tgtgaccctg gacaagtcac tgaacctctc tgtgcctctg 119820
 ttacttcata tgtaacattt gcatgagagt agctcctata tggtaggggtt attacacaag 119880
 10 ttaaatgaga caatgcagggt atctggcccc agctccctcc ctgacctctg ctcttagacc 119940
 tctttcttgt ttggttccat ccaaccacac cagcttccct gctgtgggtc aaacacacca 120000
 15 agctcattca tgcctctggg cctttgcact ctctgttccc actgccagga tcactctttc 120060
 cccagatata cacatgcctt ggtatttcag gtctcagttc aaaagccact tctcaaagt 120120
 caccaagccc agaatgcttt cagctccatg agggccctca tttctgggtc actcattccc 120180
 20 gtgtccccag cccctggcac tttggctaag caagcgtaa gcacctagcc ccgggctggc 120240
 actcgagata tgtgagcgcg tgttacgttc aactttgctt tgcaggcgag aggctctaag 120300
 25 acccagaaca cagccctccc ccaccaggaa ctcaattcca ccaaaccctt ggaaggcccc 120360
 acggctcctc tccccctccc gggaccact tcttccaaact ccagatgcaa gccagctgg 120420
 30 gcaccatcct cggccgagag gttacagcac ccaggctggc tttagcgcag acctcagatt 120480
 tcttaagcaa acgagaagag gtgaggaggc ctgtgggggc acctaaagag agaatgagtc 120540
 agtcagagct agacttgaaa cgtaagagac atcagcactt cttggaaagg caagaacgga 120600
 35 cgcattttaga cagaactgtg catgcagaat gaggggtaag cacaggccag tcagggaagt 120660
 gagtcttccg tctctgtga gtccctccac ctggccctct cttctcatt tccctctcaa 120720
 40 atgtcacctc ctcagggaag cctccctga ttcacttgc acccagcttt gctttccttc 120780
 ctagcacagt ctcacctga taggatattg caggctcatg ttctctcctg taaaatcctg 120840
 ggggccagac atagttcaga attcaggatg actcaggctg tagaaaggtc accttgata 120900
 45 aaataccac cgacatgcc atcatgcagg gcgggaaagc acccaaagat caattgcact 120960
 aatatctctg cagaaagaca tctgagcatc acaccgaaga ggatgaagac tctaaaaagc 121020
 50 ctcaagttta gcttcaaaat gagttatgaa aaactttcgg ttttcagaaa tegtggattt 121080
 cagaataaca gataaagctg ccgatctgaa catatgtatt ggtgtacat tgctgtatg 121140
 55 ctcaactaga atctaaacct caggagagca aaggacttgg tccgatgctc tggcacatat 121200
 aggtgtcaa taaattcctg aggaagaaat gcaggaggaa gccagggtgt ggatacgag 121260
 60 aagggactcg gtccaaaatg cagagaaaaa cagcaatcac tgagcgctt ccaagggcaa 121320
 aatgtctata caaactatct catgaatgct ctccctgcaa ataccatga caaaacaaag 121380
 65 ggaggctcag agagggtaaa caactcctc cagattacac agtggagagc tgggaagtag 121440

ES 2 279 916 T3

ccagctccga tttaaacctg ggatccccctc ttcaagctca ggcccttctc tctgccttaa 121500
5 gctcagagac gcagagcaat ttgctggata tcataaaaaca gtggtgatgc acccggtctg 121560
acagtggatc cccagcctc tgtagcacct caagcctctg ccggggcgct ccgatccaca 121620
10 ttcaccaagg gcaggtctgt gcaacctcca gacaagctcc tggectctct tctagcccag 121680
ccatggtaag tctagctaaa cgtggctggg catgtctcca ctgtgccage caggaggaaa 121740
actcagaaat gtctttcttg gtcaccccag tgaactggta caagcaggaa agaatacatg 121800
15 ggaagaaaag taggatggag tctgtccctc agatgtggac ctgaggcaag gctactgcat 121860
tcctctccgg gtctcagttc tcacctgcaa aatgagtggg ctaaattcca accaataaag 121920
20 ctcaaaggag gcaacagtaa agatttattc atttaggccg ggacgcttg ctcgcatcta 121980
taaatccaac actttaggag gctgaggcag gaggactgct tgagaccage agttcaagac 122040
25 tagcctaggg aacatagcaa gatcctgtct ctaaaaaatat aaaaacaatt agccagccgt 122100
gggtggcacac acctgtagtc ccagctactc aggaggctga ggtggaagga ttacttgaac 122160
ccaggtattg gatgctacag tgagctatga ttgtgccact gtgctccage ctgggaaata 122220
30 gagagagacc atggctctaa aaaaaaaaaa aaaaggtatt catttaacaa atacatagtt 122280
tgtactacat accaggtact gttttgtatg cttgacatat attaaactcat ttagtcatca 122340
35 ctacaatggc atagtacta taatctcata aatgcagaaa ctgaggctct gggaagtcag 122400
ttacacagta agcagcaaag ccagcatttg cactgggtga tctggctcaa gtccatactg 122460
40 tcactcccca gctatacgtt ttgacaggta acaacagaca tatacattga ttgtggaccc 122520
actgggtgtt ggacattgtg tgaagtagct tataaaacat gtcacaaacc ctcaagaaaag 122580
ttcactttta caaatgtgag gaagaacagt acttaggcgg cttctgtcct ggcctcactc 122640
45 ccaggtacca gtgagggcag tcgagagggt gggcatctaa tcccaaacgc tctcctccat 122700
cgtcccagat ggggtgggtg gaagagggca gggagatggg ggaggtagaa aaggttctct 122760
50 cttctcatgt atttatgtat ttgtttattt tgagacagag tctcgtctg tcacccaggc 122820
tacagtgcag tggcacaatc atagttcact gcagccttga ccacctgggc tcaagccatc 122880
55 ctcccacctc agcctcccaa atagctgggg ctagaggcac ctgctaccac gcctggctaa 122940
gtttttaaat tttttttgta ggaacaggat ctactatgt tggccaggct ggtctcaaac 123000
60 tcctgggttc aagcgatcct ctctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagtc 123060
actgcgcccc gcttgtcact tctttgacaa ttcatctcag ctcccttttg aactgggagc 123120
attagaaaaa tgaacacccc cacccttggc ctgggcattt tgaaccggg attgtattgt 123180
65 attaaacata tcagtcattg agtcacttcc tagcatttgg aaacccttag gttatctcgg 123240

ES 2 279 916 T3

acctgccggt aactgcatgt gttgtaactg gggtagtgga ctgcagggtt tectcectgc 123300
 5 tgcctcecca gegtctccct ccagattcag atccagagge ccaggggtggg gccaggaat 123360
 ctgcactgtt gcttttacia ctcaagccaa ggtgaataca ctggcccaag ttecttggca 123420
 tggcattcaa ggctttccac aatgcagccc agcccaactt tccatccatc tctggcttct 123480
 10 gcttactccc taggttctgt acacagtgcc ctttcacact tcccagcctc cgeccactct 123540
 gtgcctccct ttacctceca tectctacct gccagactcc cctgctctac tcacaaggct 123600
 15 agctcagggg ccctgggtgc tgggaagcct ggcccagtgc cttttgaaga gctgatcccc 123660
 tctggcttgt ggtcctgcag ccgctgggtgc atccgcaccc tcccagcctc cacgtctgtc 123720
 20 ttctgcaga ggggggtgctc cttgaggcaa gcaccagtgc ccagaacacc acccagggcc 123780
 tcgcaggagc tgaatgagtg ctagtgagtg aatgagtggc ttagcaggct accctccatt 123840
 catgggctgg gctagccgag ttctaagaaa cccctgcagg accctggaat gccctaattg 123900
 25 gcaggacacc ctggccaaac ctacacctga gcctgtttcc ccattggact ttgggatttt 123960
 gataaaggca ctgaggctcc agcaaagtc ttgggtcctc cataggctac tgggggcagg 124020
 30 gaagtgcagt gggctcatgc tcccagaggg ctggggaagg ggagagacta gaactggagc 124080
 agggttagcg ctggcctggg ggcattcctt gaacccaga agcagacaaa ctagtggctc 124140
 35 cctatcttgc ttaagtctaa gaaatccaga ttttgtttaa aaaaaaatc agggctcagt 124200
 ggctcacacc tgtaatccca gcattttggg aggcagaggt gggaggatca cttgaggcca 124260
 gcctggacaa catagtga caccatcttt ataaaataaa ttttaaaaa taaaataaag 124320
 40 atcagattcc tgggtttact gaatctgaat ctgaggcaa ggacctggga atctgcattt 124380
 taagcaaatc tcccggagat tctggttatt gtgggggctc ctcaaactg attgagagat 124440
 45 ggagagcagc tggctctggc gtgggattgc ctgggctcta gtctgctgc cccacggact 124500
 cccaagtggg cggcacctta gggcaagtta ctaaagcggc tgggtcttg gtgacctcat 124560
 50 ctgtacaatg tccatgacgc acagcaccgg ccacagagaa gttagtggga ggtttcactt 124620
 ggcacccctt cagtaaaaca agtcccagtc aatgatcgcg attattgggt ccatctgata 124680
 55 ttccggaggcg gagaccgccc cgattcactg acctactact caaatttaca gttctcagaa 124740
 ctttccccac cttttctctc tccgaagtcc tcaactgactt cctgagcgca gggctgggcg 124800
 ccaactgccc gagaagaggg gctgctggc ctccgacagc ctaaccccaa gccccccacc 124860
 60 cccgcaggcc gtcccggcg aggtctcact gccagcaccg gctttgggga gcgctgggtg 124920
 tccacgtacc cgggacctcg cgcctcctgt gcggttcggc ggcaaggacg gaaccgggcg 124980
 65 ctgctccgcg cgcaccgaga gtcgcgggct cgggccccgc tcggagtcgg ggtggtcccc 125040

ES 2 279 916 T3

gtgggtccccg cgggcggccg agcccttccc gaacgccttc agccggcggtg cccgggcgat 125100
 accttcgcaa cccgatccgc gcgcggggccc cggatccctac ctgcgcgcgc ctgctccatt 125160
 5 cgcgcgtccgg gcgcaccaagc gggaggtggg ggacccctgg gtggcccttc cctggcccg 125220
 gcgcgcgggg gctttcctgg gcgcggagac ccagcccgcc ccggttctct gctccccgc 125280
 10 ccggcgccccg gcagatttgc atgcgcgcgc ccgcgcggcg cgcgcggccc ggggtcccg 125340
 cacctgcgc ccctgtcgt gtccccgcgc ccgcgcgcgg acagtcgcag ccgcgcctct 125400
 15 ctctggggg cgacccagc acctcgctgg gtgtcttgcc gcgcgccttc tcccacgctg 125460
 cagcccgagg tcacgcccag cggagaactc tgcagtggat ccccttggc tcggaataaa 125520
 acgcccacgc cgaccaggcc tccaggacct gctcctgcct ggcctccgc gctctttttg 125580
 20 cgcgcggggca gttgcgtttg tggggggagg gctgggcgac tggaaacttc ccccccttc 125640
 taacagcccc gcttccaagt gagagtgggt gcacattctt caataaatgt ttacccaact 125700
 25 cctactccag ccacatttgg atagtaaaac agcccttcaa tcagtaacta gtacaatctg 125760
 tcgggcactg caaatgttaa ctgcgttcaat cctggcaact accctataag ggagtgtac 125820
 30 tatcacgggt ttacaaatc aggaactga ggcacagagt ccttaagaaa ttcaaatgg 125880
 gttgggcaaa gtggctcatg cctgtaatcc cagcactttg ggaagctgag gcgggaggat 125940
 cacttgaacc ccatagtctg agaccagcct gggcaacct gttagcgaga cccctatcta 126000
 35 caaaaattga catttataaa attttaaaaa agaaaagaaa gaaactcaga atcactctgc 126060
 aggtaaagcag gagcaggggt ggagctggga ttcgaaacac ggccccatag accattaacg 126120
 40 tctggacacc ataagaacc ggatgcagcc agatgactgg ggggaaaaca ctcaacaaag 126180
 tatttcaggt caggagggcc caagaagaaa gtagggaacct cttagaccag tggggcaggt 126240
 45 ggtctggaag aggtcttttg agtagaggcc atttgagctg agactctgaa gagcctatgg 126300
 gggagactt gtgtaggag agggaagagc tagtgcaaag gccctgtggg aaccagctca 126360
 50 gcctgcagga ggaattgctg aaggccggca tggctgtgga gccctgagtg aggaaagagc 126420
 ggagacaggg gaggtgggag atatttggac tcacactggg cagtgtgag aaccagaga 126480
 gtaatttgac cccctgctgc cctcaaggag ctctcagttt gaggggtgaa gccaggact 126540
 55 gccaatggg atcaagtgt gtggtggagg gtgagggttg gcttcccagg gcaggggcca 126600
 ctgcacgtca atcattcttt tttttttttt gaagatgggg tctcattcca ttgcctaggc 126660
 60 tggagtgcag tgggtgatct cagctcactg caacctccac ttcctgagtt caagcaattc 126720
 tctgcctca gcctcctgag tagctggaat tacaagcgtg caccaccag tccggctcat 126780
 65 ttttgatatt ttagtagaca tgaggtttca ctatgttggc caggctggta tcaaaactct 126840

ES 2 279 916 T3

gacctcaggt gatctgcctg cctctgcctc ccgaagtgct gggattacag gtgtgagcca 126900
 ccacgcctgg cccatatgtc aatcattctt tcatgtactt ggtctgtctt ggtcctactg 126960
 5 tgtgtctaac cttgtgacaa gcgctgatga cgcagacctg aagacatgaa acagacacaa 127020
 tccctgcctt ctgagacctt acaaccaagt gagcaagaca gccaccaacc cccccccaga 127080
 10 agtgacagta aagataagtc agttccctgg ggtcagggat ggcttcctgg aggaggtgac 127140
 ctctgaccag tgctgaatc aatgcagaaa aacatgcagg tggaaggagac agcatgagca 127200
 15 aatacctgga ggtggcgtgg gagtgtggaa aaactcccat ccttcggcat ctgtttgtgg 127260
 atgcctccat atgccaagtc gtgagctggg ggctagggag agcaagaaat agatccagcc 127320
 20 cctgcttctt agccctgagg acctgggtgg ggcactgaca agtgagcaga cgtaagcaat 127380
 tgaagtgaac agatgtaagc aattgagtgt aataaacccc gtactggggg cagcccaggc 127440
 agacgctaag aggactaggg agagaaggcc acaggaaggg ctttcctgga agcttgggtt 127500
 25 tcaggaggaa taggaatcct ctggattagg tgtgacttcc actcccgtec aactcatac 127560
 tccctcacac tcattactca cacatccyca cccccacag gttgatgctt catcccaggc 127620
 30 agttcagccc tgcaagctgc ctttgtcctg tctgtgttcc tgagtttgtg ccccatgtca 127680
 tcgggagacg acagcaaaag tctacctttg aagtcccttg ggaatgtatg gcttgggcta 127740
 35 tatccctccc tggactccca aactgggctc ccactctgtt tcccagtea agtcatectt 127800
 cgtcgggttcc ctgccttgcc tctagactgc cggcattggc ataccaactc tgctacgtat 127860
 tgactatgtg actttgggca aagtagatca tctccctgtt gcttcagttt ccccatctgt 127920
 40 aaaatgggga taataataga cccacctcat agggctatga aatggtgaaa tggcaaggta 127980
 cgtatcgag tgcttagaat agtgccctggc gtggattagg cattcaaaat gtcaattgct 128040
 45 gttcttatca ggatgaaaat gagaaagaag caaagtcgaa gcctgttgcc ttggtctgtt 128100
 gcttgggtgt gaaatggaga tgaacgtggc attgagaaga caggcaaaga aagcacagct 128160
 50 gtggtcagag gctaagacat tcaggaaatc tgggggaaga gacttcggga attctttgta 128220
 ctcttctccc aactttcccg ccagtctgaa attatgtcaa attacaaagt taaagaaaac 128280
 55 agggcattgt tctcgggtgc aagagagata ataaatgtct tcttcatac agtcccactg 128340
 ttcaagttcc tgcccaagat gccagactt tatctgtgac tgctccgta gtccctgggag 128400
 caggtccaaa ggcaccaaga tagtaaaacc tctgttcccc catctagggg ttcccaagtc 128460
 60 ttgcctcagt ataagctcaa tctcattat atcctaacac gcttacttgt ttccaagcct 128520
 ttcggtcttt aaaactaata gagtttattt tttagaacca ttgtagatta tggaaaaatt 128580
 65 gagccgatag tactgagagt tcccatatc cctctcccc catgcaaaat ttcctctttt 128640

ES 2 279 916 T3

atcaacatct tgcattagt tgtagtgcct cccttataat gctgatacat tattataaac 128700
 taaagtccat agcatacatt gtttccactgt ttctcgggggt tttgttttgt tttgttttgt 128760
 tttgtgtttg tttgcttgtt tggaaacaag gtctcactct gttgcccagg ctggagcagc 128820
 ctggaactcc tggactcagg ggatcctcct gcttctgcct tctgagtagc ttgggctaca 128880
 agaacatgcc accacactag gctttttttt ttttatactt ttagagacag tcttgcctaca 128940
 ttgcccagec tgggtctcaga ctcttaagct gaagttatcc ttccatctca gcctcctaaa 129000
 gtgctgggat tacaagcatg agccactgtg cctaacctct gcagcacagt tctgagctct 129060
 ttttttttct ttgagacaga gtcttgttct gtcacccagg ctggggtaca gtggcgtagt 129120
 ctcaactcac tgcaacctgt gcctcccagg ttcaagegat tctcactcct cagccttcca 129180
 agtagctggg actacagggt cagcctggc taatttttgt atttttagta gagacggagt 129240
 ttccccatac tggccaagct ggttttgaac tctgacctc aagtgatcca ccagcctcgg 129300
 cctcccaaag tgttgggatt acaggcatga gccaatgcac ccagccaagt tctgggtctt 129360
 aacaatgtat aatgccatgg atccacacat gtagcaacaa aaagaatagt ttcccagcct 129420
 gggcaacata gcaagacctg gtctctacca aaaaacacaa acaacaaca acaacaaaaa 129480
 acaggccagg catggtggtg cactgtagtc ccagctactc agaggctgag gcaggaggat 129540
 cccttgagcc caggagtctg aggctgcagt gaactatgat catgccactg cactccagcc 129600
 tgggcaacag aatgagacct tgtctctaaa aaaaaaaga aaaaaataaa gaatagtttt 129660
 acttccctaa aaatcccca ttctctacct attcttctg gattctggaa accactgatt 129720
 ttttactgt ctccatagtt ttgcctttt cagaatgtca cgtaattgaa atcagaaagt 129780
 atgtagcttc ttaatactga ctctttttac ttagcaatat gcttttcagg ttcctcaatg 129840
 tcttttccag gcttcacacc tcatttctt ttgtggctga atagtgcct attgtatgga 129900
 tgtaccacag tttatccatt ctacctattg aaagacatct ttgttgcttc caatttttgg 129960
 caattatgaa taaagctgct atcaacactc atgtgcaagt ttttgggtgg acataagctt 130020

<210> 89

<211> 9900

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 89

gaattcaata aaaaacaagc agggcgctg gtggggcact gactaggagg gctgatttgt 60
 aagttggtaa gactgtagct ctttttctta attagctgag gatgtgttta ggttccattc 120
 aaaaagtggg cattcctggc caggcatggg ggctcacacc tgtaatctca gagcttttgg 180

ES 2 279 916 T3

	agactgaggt aggaggatca cttgagccca ggaatttgag atgagcctag gcaacatagt	240
5	gagactctta tctctatcaa aaaataaaaa taaaaatgag ccaggcatgg tgcgggtggac	300
	cacgcaccta ctgctagggg ggctgaggtg ggaggatcat tgagcctggg aggttgaggc	360
	tgcagtgatc cctgatcaaa cattgcattt cagcctgggt gacagagtga gacctgtct	420
10	cagaaaaaaaa aaaaaaagt cattcctgaa acctcagaat agacctacct tgccaagggc	480
	ttccttatgg gtaaggacct tatggacctg ctgggaccca aactaggcct cacctgatac	540
15	gacctgtcct tctcaaaaca ctaaacttgg gagaacattg tccccagtg ctggggtagg	600
	agagtctgcc tgttattctg cctctatgca gagaaggagc cccagatcat cttttccatg	660
20	acaggacagt ttccaagatg ccacctgtac ttggaagaag ccagggttaa atacttttca	720
	agtaaaactt tcttgatatt actctatctt tcccaggag gactgcatta caacaaattc	780
	ggacacctgt ggccctctcc ttctatgcaa agcaaaaagc cagcagcagc cccaagctga	840
25	taagattaat ctaaagagca aattatgggt caatttecta tgctgaaact ttgtagttaa	900
	ttttttaaaa aggtttcatt ttcctattgg tctgatttca caggaacatt ttacctgttt	960
30	gtgaggcatt ttttctctg gaagagaggt gctgattggc cccaagtga tgacaatctg	1020
	gtgtaacgaa aattttccaat gtaaactcat tttccctcgg tttcagcaat tttaaatcta	1080
35	tatatagaga tatctttgtc agcattgcat cgttagcttc tcctgataaa ctaattgcct	1140
	cacattgtca ctgcaaatcg acacctatta atgggtctca cctcccaact gcttccccct	1200
	ctgttcttcc tgctagcatg tgccggcaac tttgtccacg gacacaagtg cgatatcacc	1260
40	ttacaggaga tcatcaaaac tttgaacagc ctacagagc agaagggtgag tacctatctg	1320
	gcaccatctc tcagatggt ctgggtgatg tctcagtatt tctaggcatg aaaacgttaa	1380
45	cagctgctag agaagttgga actggttggt ggtggcagtc cagggcacac agcgaggcct	1440
	ctccctgcca ctcttttttc tgaggggttg taggaagttt cctcagttgg agggagtga	1500
50	agctgctcat caaggacttc tctgtccggg tggagggtta ctctgtctct tgctctctca	1560
	tttctgcctg gaccaagact ctgtgcaccg agttgaccgt aacagacatc tttgctgcct	1620
	ccaaggtaag aagcogtccc acggtctggt ttageaaaatg gggagatcca tccccaaatg	1680
55	tctgaacaag aaacttgtct aatggaaaac gagcggggcc aaattaactc taagggtgta	1740
	gatgttttca aagaacgaga agtctgatct ttactcttaa gcatgttttg gtctttcttg	1800
60	tttcaactga tttagaagac atgtaataga aagcttacat gctgtagtcc tgactcagat	1860
	cctggtcaaa gaaaagccct cttgggtttt acttagcttt ggcatagtgc ctggaacgta	1920
65	ggaggcactc aataaatgcc tgttgaatga gagaattttt ctggcccata catttctgaa	1980

ES 2 279 916 T3

	aaaccaata ctctcacaga aacagatatt gagatgacag gttgagggag ctttcatttt	2040
5	gtctaagaga cttcctatgg caacagaaaa ggtatcgcca gagccctcc tcttcacag	2100
	cctggccacc taacagccct ctgggtccgg ggtgcccgc cagagctctc agcttgctct	2160
	ggcgggcca actccctcc agctcggctt ggaaccatcc tgcggggcag cgtccagcac	2220
10	atccctgctt cgggctgctt gggcacctcg cctctctgcc tctgtgctg cctcaccctc	2280
	acccctctat ctgtagtggg agggagatag atttgacagc tgatagtgc tttctctga	2340
15	caaacacatg actacagccg tatcaatagt tttgtgcatt tcagttcctg ttttcattga	2400
	aacacacggc tgagaatgaa agcccaaaag cctcaatttc acagtggctt cctaactacc	2460
20	tgccttccat gcaaaactagg gagatgatat ggccaggagt gaagccctgt gtgttgggca	2520
	gggtcacact ccagcaccca gaccatagaa caggggccat cctgcttcat gagggaaact	2580
	gctcttcggg cctttagctg gactatctca tttcattagt tatcccgga gtccgataca	2640
25	ggatgagatt ctgaagggca aatacacact tttttttttt ttttgagata gggctctgtt	2700
	ctgtcaccca ggctggagtg cagtgggtgc atttcagctc atagcagcct ccacctcca	2760
30	ggctcaagct atcttctac ctccagctcc caagtagccg ggacgacagg tgtgcaccac	2820
	caagcctggc taatttttgt attttttgt agagatggag tcttgccatt ttgccaggc	2880
35	ttgtctcgaa cttctgggtc caagcaatcc gtccacctcg gcctctcaa gtgctgggat	2940
	tagccactgc acctgggcaa cagtttatgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atatatgtgt	3000
	gtgtgtgtat atatatgtgt gtatgtatat atgtgtatgt atatgtgtgt gtgtgtgtgt	3060
40	gtgtgtgtgt gtgtataaaa tctccaagtc catccaaccg agatggctcc tactagaagc	3120
	caagagtcca ccgggttgag cactgggtct ctggaggcct gtcggactgc tgagaaggct	3180
45	ctaacaagc caagggaagg gccacctcac tagaagccag gcctggagga aggggtgagg	3240
	ctgagggtcg gaggtgaagc tgccctgtgt tttagaccca ggctctgcca ctgactagct	3300
50	gtgtggctgg ccttcagaca tcttcacagc tctctgcacc tcagtttcca catgtgaaga	3360
	tatgaaagtg attctgaagg tgattgcaag gttgattgga atccagctct tgagttagt	3420
55	caaagtgtta ttgtgagatg atataaccac gattaaaagc aagaacaggt gcagagaagc	3480
	gatgattcta agaaggaggg gaccgggttg gaaaggatca aaccatccag gatgccgagt	3540
	ctggggcaat ccatctgggc tgtttctgga agaccccggt gtgcaggcca ggacactgct	3600
60	gccctccctt ccttaactcc cctcttcaact cagtcctcac tcacctccct ctcacacaca	3660
	caaacatctc ctagaataat ccccaactgc tgcccttcaact cttaccctgc tcatttgctt	3720
65	ccctgaact tcactcctct ggagttcacg atctcactct tcactctttt cttccctctg	3780

ES 2 279 916 T3

aagattcagc actgcttact tacatgtaa gatatttcag aacagtgaag tggtgctatt 3840
 5 ttcaaaaacc tacaaagggtg gtatgcagag gaaaagggtac ttctttgtgt tcccaaagaa 3900
 aacatctttc caaaatccag cctattgatt ttattttcttc gggggaacaa gaatttttagt 3960
 atctctaagt tgggtagcat tctactcttg gcagttgctg gaaagaaggc actggtctag 4020
 10 gtccctgggtc tcacaggtaa cacctgtcag ggtgtctatg aagtcaaggc tgtctgagga 4080
 acagcaaagt ggggaagaagc aagctggctg gctgatgaag ggtttcttgg gtggacaagt 4140
 15 agttggagcg atttcctatt taccaaagag agctaaagtt cataattcta cagagagttc 4200
 cataatgaac ctcaaatacc tctgtttttt gaaggagttt ctcatataca gcaactagctg 4260
 20 actatcctgg gcaggatggg agataatgaa tgcagtgcca atcgggctgg atttatatgg 4320
 tcttagtgag gctgggtcaag aaccgagtta gaactctcac agagtcactg cccacagaag 4380
 aaatctccca agtggctgtt tcttgacatt cccgggaggc aggcctcctt ctgagtcact 4440
 25 cctaagcag ttctgaactg tgaggtcagc caggtgtcc aagtgcactc cctgagccac 4500
 tggcagacac actcagcagc cagagctaga caggcagggtg gtaggagtc caggccacgg 4560
 30 cagggatgga gtgtcgcccc ctgctgcga taccagagca agtaaaacgt taaggccttg 4620
 cactaaagct gcccttagga tgcattcttt taaagttttt ccatttaagt cagactcttt 4680
 35 tcaattctta ttttatcctt gtttccttta gaaagtcctt tgaataatc ctttagaggg 4740
 ttttttcta tactatgtgg ccatatacgg gtcaaaatta agtttaattt ccaggctcca 4800
 agccagcgtt tcagaaaaat ctaccaagg tttgtggtaa aagaagcaaa gggctgactt 4860
 40 tttggttttc ttgaatctca ctgttccctc tgcagcagca tgcattgtctg cccacctcca 4920
 gacacacagg caccatctgc cgtcccccat cagcccggtt ccttccacc tgcactgcc 4980
 45 tacaaagccc agagaggtct gtttcttggc cccagagcc caaagatact gacacactct 5040
 tacatttcca actagaatca ggaacgagga gtgactctca gtcagttcat taagtaaagt 5100
 50 tcttttctaac cgctctgccc atgggacatc acgccccaca ggggaaaggg gaagcttctg 5160
 tagcctggga ttctggtgcc tcagtctggg tctagacttt cctgaaaaaa cgttaaaata 5220
 tgaactgcat tcttagaatt tagcctacat aaataagaga tgaacacaaa gatttctata 5280
 55 gtttactcac tgccgcttat ttacagaagc aaaaatctgc cagcataggg gctgacaaa 5340
 tgacagtacc actgtgcaat gcgtttctac gcagctctca atccatgtt ctctaatacc 5400
 60 accgaaggtc taggaaatgc ttatggtata tgtaaagagt aaagaagtta caaacagtat 5460
 caacagttga cccctatttt aaaaagtatt tttgaaaagt gtgacgatat ttaccaaata 5520
 65 attaacgagc aatagttacc tctggctggg gggatgagtg aatgtatttt tggtgaatat 5580

ES 2 279 916 T3

atgttacctt tatagtaa atattgttatc ttgatcatca gaaaaaaaaa tatgtaagaa 5640
 5 cttgaaagct gcttggacag cgctgctgat agaaaccctt gagcatcttg tcaetgttct 5700
 tctgattcag agggctctggg tggggcaggg gtggctctgag attctgtatt tctaagaagc 5760
 tcccagtgat gtccatgctg ctgtccatgg accacacttt gagtatcaag ggaccagagc 5820
 10 atgtcggggg agaggtctggg gatagctttc tttatctgaa ctggataaag gaactgggct 5880
 caagctaaga accctctcca ggttctgcat ctttgttctt cagtgaaaaa tgagaggaca 5940
 15 caccaggcca ggttcagact gagacacaat cctctctctg ggttcccaat gacttgtctc 6000
 ttgtccattc ccttctctaa ggctaagggc cccccaggaa gagccatgtg gccagaccct 6060
 20 cacagttgct ggcattccaa ggagattctc actccgcac attggtccaa aaggccctt 6120
 acagaagctc tgcccaaggc tcagatcaat ggcacctgct cccagagctc ctctgatctc 6180
 ccaggacacc tttccctgat ctgtgcactt atctcttgct gcctggcaaa atgtcttagc 6240
 25 tctcacttg ggccatgtgc tgctctctc tcccatgggg agagccacac ggagagtgtc 6300
 ggccaaagca gcagagttca ggccaaagga tgtgcactca tttattcaac aggcattgag 6360
 30 gatttccagg gaaagctgga ttttaaaacc tctgggaaca agagcagaac ctgactgaga 6420
 gctcatgtgg gcacttttca tagcagaata gctcatgagg tatagagaca cggacgcaga 6480
 35 acgtgggctg tagcgacaga tggctctgca ttctagtccc cactgtgcct tttcctcatg 6540
 ggatgacttt attcaggtac cctttcggca aaatcctcca agagaaagga aactgggagg 6600
 ttctggggag aaggctgctg cgtttgcaat tgggagaggt tgttgacaga ggtttatgtc 6660
 40 tgtggcaagc agccttctt cagtggaata cttgaagaca ggtctgtagt tgagcaaact 6720
 cacctccatt tgtcctctg gaaagaagaa atcaagagga aaaatctctc tcccatcctc 6780
 45 caaatggagc tggcacattg ctatctgtgg catttgtctt tccagaacac aactgagaag 6840
 gaaaccttct gcagggctgc gactgtgctc cggcagttct acagccacca tgagaaggac 6900
 50 actcgctgcc tgggtgcgac tgcacagcag tcccacaggc acaagcagct gatccgatc 6960
 ctgaaacggc tcgacaggaa cctctggggc ctggcgggct tggtaagctg cactgtattc 7020
 ctggcaagcc ggccgcgtgg ctctgggtgg acagcagcct cacttctaaa cactccttag 7080
 55 gagctgcagc acccttggtc aaccatttca ttcatcact cattcaataa gtatttgctg 7140
 aagttccaca agtgctgggt gtggttctag gtgctgagga cgtgtcacta aagacagcag 7200
 60 gccgagctcc tgttctcatg gaatgttcta atgggagagt tagaaaaa aacatgtaaa 7260
 atgatggcca gcagtgatac gtgctacaaa gaaaaacata gaaataaaga acataagagt 7320
 65 catgggggag ggggctgact taggagctgg tgacattatc tgagcagata tttgaattga 7380

ES 2 279 916 T3

	gggagcaggc	cacatgacta	actagggaga	ccattccagg	gagaaggagg	aggatatcaa	7440
5	aggccttagg	atggaaatga	actaacttcc	tgtattttaa	gaccagtagg	aaggccagtg	7500
	tggctggatc	agagtgagtg	aggggtagtt	tccaggacag	cagatcacac	aaggccttta	7560
	gattccacca	cgagtatgga	gggaacacct	gcagagcttt	gggcaggaca	aagactgtac	7620
10	aatctgattt	acgtgattta	aaagggtcag	tctggctact	gtgtggtaaa	taggctgaaa	7680
	gggggaaagc	atagaagcaa	gatggcctgt	tgggaggcta	ccacagtaaa	ccaggctaga	7740
15	gatgatgggtg	gcgtggacag	aatgaagcaa	gatggcctgt	tgggaggcta	ccacagtaaa	7800
	ccaggctaga	gatgatgggtg	gcgtggacag	aatgaagcaa	gatggcctgt	tgggaggcta	7860
	ccacagtaaa	ccaggctaga	gatgatgggtg	gcgtggacaa	atggagcagt	tgagggtgaac	7920
20	agatttggga	tatgactaaa	aataaaacca	gaagatttgc	tgacagatcg	gttgtagggg	7980
	gtaagataca	ggggaggaaa	agatgacctc	tttgttctcg	cccaaaccct	tctggcgatg	8040
25	gtcagtactg	tttacagaga	gatgaaagac	tggcggcaag	gcagggctgg	aggttcagca	8100
	gaagatcaag	agttcaattt	tgtacatcgt	acatgtaagg	tggctcttgg	atagccaagt	8160
30	gaagggtgtg	agaagatggg	tagaaaagtc	tggaaacttag	gggagagggtc	agaacttgca	8220
	atacaaaaag	gagagtcctt	agatagatac	tgctgaaaat	ctgaatgaca	gaaagggaga	8280
35	gatcaaagga	ctgagcctga	gatcaacaca	tggagggtcag	gagaggagga	tccagccaag	8340
	gggcctgagg	aggagtgacc	agtgaggcag	gagaacatgg	agagtgggcg	gtaccccgag	8400
	aagccggtga	ggacactcaa	ggagggagggg	ttgactgtgt	caaatgtact	gaaaggacag	8460
40	gtcagggtgag	gaccaagaaa	ggcccttggg	tttggctgat	ggaggccatg	ggtgaggctg	8520
	atgtaaattg	agaggcagga	aggaaagccc	agctggagtg	ggctcaccga	ggatagggtg	8580
45	gcgagaggag	acaaagaagg	aacagtgagg	gcagacaact	ctttgaagat	gtttagctat	8640
	aaggctgcag	agaaactgag	cccacagctg	cagggtgggt	atggagtgag	ggaagctctt	8700
50	ttaagggttg	gggtataccc	agcatgttaa	tgcacctggg	ggaatgggtc	agtggagcag	8760
	gaagaactga	agagagcaga	aagaggaaga	atcattaggg	ggcagaagtc	cttgtagccc	8820
	agagtggatg	ttatctaata	tcgagtggag	gaattaatcg	gctttagagg	agaacaagga	8880
55	catgtatccc	ctctctgggc	ctatcacctt	gtagacaatg	ggatagggtca	tgggatagga	8940
	acttggcaca	acacatgttc	tctcttttaa	ttctctccat	tatcttatga	agcaggcaag	9000
60	taggcaaaca	attgtcccaa	ctttacaaaa	gaaactgaag	cttttataaa	ttaagtagta	9060
	catcctaagc	aatacaatta	ataaatggta	gagctgagat	tcaaactgaa	gcagtggcct	9120
65	gggggtagca	tctggaatcc	ttcccacctt	tagggctgct	gtgctgcggc	gctgctgttt	9180

ES 2 279 916 T3

5 aatggcacag agggccagat gactgaatct ctctcagcag tccaggcagt catgcagaag 9240
 gccagtaga gcaccgggca ggtctgagcc agcatcttca agttccaccc tgtgagcaag 9300
 cacttagctg tgacacactt ctcgagagac tggactcccc cccgcgcaac ccacccaaaa 9360
 gcagataggt aatggtatac agtaaccatt tctagaagtg taagtagtat gcacccaaaa 9420
 10 taggcaaaac ctgctggcct agtgatagag acaactccca gtcaggctag actggaggcc 9480
 ttgggttttat aagtgttcag gtgacaagtg ccacagtagg cttgatcaag tagacaggca 9540
 ggcaagacaa atgcttacca atgcaagcta atgaaatgtt tcttttgcag aattcctgtc 9600
 ctgtgaagga agccaaccag agtacgttgg aaaacttctt ggaaaggcta aagacgatca 9660
 tgagagagaa atattcaaag tgttcgagct gaatatttta atttatgagt ttttgatagc 9720
 20 tttattttttt aagtatttat atatttataa ctcatcataa aataaagtat atatagaatc 9780
 taacagcaat ggcatttaat gtattggcta tgtttacttg acaaataaaa ttatggtttg 9840
 25 caacttttag ggaaatcaat ttagtttacc aagagactat aaatgctatg gagccaaaac 9900

<210> 90

30 <211> 4740

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 90

 ggatccccgc tgacaatcta gaaacaagca acaggaccct ctgatgtagc catctgtgcc 60
 gcgcctctcc gcaccgcccc ccacgccttg gtccctggag accaccctcc agggcagggg 120
 40 ctgcccctcg gccgggcccc cggggctcct cggcctgaca tggccggtgc tggagcgcca 180
 cgtgcgcgcc tcggcccttc ggccgctccc gccctcgcgc ggtgcgcacc ggcgctcggg 240
 gagccgctgg cccgggtgtc cagccggccc ttgccctgce tggcgctcgg accgcccct 300
 45 ttgccgcccc ctgccagcc tcgcagctt ccagactggc cggctctgcgc gccaccct 360
 gcctccccga ccggccaccg ccgaggcgcg gaggagggcc cggccgcgca gatcccgtt 420
 atcgcccat ctcccgttac ataaggccac ccccttatct ccgcgggcca tcgcgcgcgc 480
 50 aaccgcccgc ccagcgctt ctcccacgcg cggggggcgc cctgccacc gctcccggca 540
 gggcttttgg tggccatggg ggataagggg cgttgactca cccgggcggg gctccgggag 600
 55 ttgcacagac caaggtagtt ccccgctcct tccccatca cggagaccct gtgggagatg 660
 ccgtgggccc tctactacag attaggaaac aggcccgtag aggggtcaca cgccaagta 720
 gcggcactcc aggcactggg ggccctcgag ggggaagggc agacttcttg gagtcagagc 780
 60 cagcagctgg gctgggaagc ttcgagtgtg gacagagagg gtgggaatga cgttccctgt 840
 ggggaagagag ggtggcaagc ctgggatgcc tctgagcggg aatccagcat gccttgtgag 900

65

ES 2 279 916 T3

	gaggggcaca agcacaccct tgtgaggagg ttgagcccca tggaggacag gacggaggga	960
5	gcctgagcag gcagagaggg ggccctgggga ggcgctgggt cggggaggaa gtgggtaggg	1020
	gagaaatctt gacatcaaca cccaacaggc aaatgccgtg gcctctgctg tgggggtttc	1080
	tggaggactt ctaggaaaac gaggggaagag caggaaaagg cgacatgctg cagagactgg	1140
10	tgagcaaagg ggatcacccc aagccccagt ggcactagga acacttaca tctctgacct	1200
	ggactaaggc tgccagctgg ccaggttaag agtttcccag aaggatggcc catacacttt	1260
15	aaattaaagg ggccagacac gtgcacacta cttccagcca ctctggaagc tgagggtgggg	1320
	ggatcgcttg agtctgggag ttggaggcca gcctaggcag gcaacatagt gagaccccat	1380
20	ctccaaaaaa acaaaacaaa acaaaacaaa aaaacaccaa aaaagctccc agaaagacct	1440
	ctgaatcttt ctggatctct cagtggagac cttggaaatc tgaactttga caatccctct	1500
	cacagtgggg ccaaggaggga attaggcaag ccaaaagaag tgaactttac tcttctattg	1560
25	cctgtttgaa ttttgtatcc aagcaagtgt tacttaagta atttaagaga ctgggttcac	1620
	gaaaaataa aactcccca attlcccatag ctggtagact gtggtcacag ccacagtgc	1680
30	ctaagactat ctgctcagca cttctgggtga cccaaaaggg tctgaggaca ggagctcaga	1740
	gttgggtcag ctgtccaggc actcagggtt gtcacaggca aaactgctgg aactcagggc	1800
35	agcattgcaa atgccacgcc gctctcaggg ccccttgcc tccgctggaa ttaaaccac	1860
	ccagatcttg gaaactctgc cctggaccct tctcaataag tccatgagaa atcaaactct	1920
	ttcctttatg cgacactgga ttttccacaa agtaaaatca agatgagtaa agatgtgggt	1980
40	tctagatagt gcctgaaaaa gcagagacca tgggtgtcagg cgtcaccact tgggcctata	2040
	aaagctgcca caagacgcca aggccacaag ccaccagcc tatgcatccg ctctcaatc	2100
45	ctctcctgtt ggcactgggc ctcatggcgc ttttgttgac cactgtcatt gctctcactt	2160
	gccttgggcg ctttgccctc ccaggccctg tgccctccctc tacagccctc agggagctca	2220
50	ttgaggagct ggtcaacatc acccagaacc agaagggtgag tgtcggctag ccagggtcct	2280
	agctatgagg gctccagggt gggtgattcc caagatgagg tcatgagcag gctgggcctg	2340
	gtcctaagat gcctgtaggt caggaaaaat ctccatggac caaggcccgg ccagcccatg	2400
55	agggagagag gagctgggct gggggggtca gcaactgtgga tggacctatg gaggtgtctg	2460
	gcagactccc cagggactac ctgctctcct ggcctggcct tgtctgccac tgccagctcc	2520
60	tactcagcca ttcctgaaca gaggacagca gagaagggtc cagcaccctc ccagaaccat	2580
	gtggcatttg ccaactggat ttgaccata acaatgcagc cattctcccc agcaccatca	2640
65	taggcccgc cttacaggag gattcggttag tagagtcgct ccttgcccca ctagtaacag	2700

ES 2 279 916 T3

	ctcacatgtc ttgagcactg cttacaccag gcctgggtgca cgtgctttat gtgtcatttc	2760
	atcactgcca gccacctcaa gaggcaggta cgatgaaccc attctgctaa ggttcgtgag	2820
5	gttaagtga agagggctga ttcaagccag gcctggccaa caccagagtg tccatgctcc	2880
	taactgcagt gttccctcac catcagaagg cagggcattt aatacaccag atccccaccg	2940
10	cctcccattc gatttgtctt ggtaacatg gccaggcca ctctacttc actcgtcccc	3000
	acctgaccc tccccgagg cccctgtcct cctgccctga ctatggcaag ccttgcctgc	3060
	agcttgctcc ttactagtgg tgtcaatttt ttctctcag ctccaagacc ctaaaccagt	3120
15	ggacctcacc cctatgcctg ctgttcaaag cagaaaacga agctcaggaa tgctgagggg	3180
	ctgccaggcc tgcctctgtg ccacaccagg gatgcttgtg gggcctgtgc tggggcagac	3240
20	ctggcctggg ctgccagggc agggccacaa cccctgccag cactctgtct actgtcactt	3300
	tgctcccaca gcgtccgtct tgcaatggca gcatgggatg gagcatcaac ctgacagctg	3360
	gcatggtaag gacctttggg tgcagggagg atggggcaga ggctccaggc cttgggctta	3420
25	tcttctctga gctcccttc catggtctggg gtccaagca agcttcaagt gctctcctcc	3480
	ctcccgccat aatctggccc ctccccgcc accaccaga ctacctgcg ccaggcatct	3540
30	cagccccatc ttctctcaga ctcaaaaag gcagctgccc aagcagggcc tgacctctcg	3600
	gtgtcccttc cccacagtac tgtgcagccc tggaaacct gatcaactg tcaggctgca	3660
	gtgccatcga gaagaccag aggatgctga gcggattctg cccgcacaag gtctcagctg	3720
35	gggtaaggca tccccaccc tctcacacc accctgcacc cctctctgcc aacctgggc	3780
	tcgctgaagg gaagctggt gaatatccat ggtgtgtgtc caccagggg tggggccatt	3840
	gtggcagcag ggacgtggc ttcgggattt acaggatctg ggctcaaggg ctcttaactc	3900
40	ctacctgggc ctcaatttc acatctgtac agtagaggta ctaacagtac ccacctcatg	3960
	gggacttccg tgaggactga atgagacagt ccctggaaag cccctggttt gtgcgagctg	4020
45	tcccgccctc tggcgttcta ctacgtgct gacctctttg tctgcagca gttttccagc	4080
	ttgcatgtcc gagacaccaa aatcgagggt gccagtttg taaaggacct gctcttacat	4140
	ttaaagaaac tttttcgga gggacgggtt aactgaaact tcgaaagcat cattatttgc	4200
50	agagacagga cctgactatt gaagttgcag attcattttt cttctctgat tcaaaaatgt	4260
	cttgggtagg cgggaaggag ggttagggag gggtaaaatt ccttagctta gacctcagcc	4320
55	tgtgctgcc gtcttcagcc tagccgacct cagccttccc cttgcccagg gctcagcctg	4380
	gtgggectcc tctgtccagg gccctgagct cgggtggacc agggatgaca tgctccctaca	4440
	ccccctccct gccctagagc aactgttagc attacagtgg gtgccccct tgccagacat	4500
60	gtggtgggac agggacccac ttcacacaca ggcaactgag gcagacagca gctcaggcac	4560
	acttctctct ggtcttattt attattgtgt gttatttaaa tgagtgtgtt tgtcacggtt	4620
	ggggattggg gaagactgtg gctgctggca cttggagcca agggttcaga gactcagggc	4680
65	cccagcacta aagcagtggg ccccgagggt cctgggtaat aagtactgtg tacagaattc	4740