

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 065**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 17184486 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3301177**

54 Título: **Agentes de iARN, composiciones y métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades asociadas con transtiretina (TTR)**

30 Prioridad:

18.11.2011 US 201161561710 P

26.03.2012 US 201261615618 P

06.08.2012 US 201261680098 P

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

23.12.2020

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 Third Street, 3rd Floor
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**KALLANTHOTTATHIL, RAJEEV G.;
ZIMMERMANN, TRACY;
MANOHARAN, MUTHIAH;
MAIER, MARTIN;
KUCHIMANCHI, SATYANARAYANA y
CHARISSE, KLAUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 800 065 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

Agentes de iARN, composiciones y métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades asociadas con transtiretina (TTR)

5 **Antecedentes de la invención**

La transtiretina (TTR) (también conocida como prealbúmina) se encuentra en el suero y fluido cerebroespinal (FCE). La TTR transporta proteína de unión a retinol (RBP) y tiroxina (T4) y también actúa como portadora de retinol (vitamina A) a través de su asociación con RBP en la sangre y el FCE. La transtiretina recibe su nombre por su **transporte de tiroxina y retinol**. La TTR también funciona como una proteasa y puede escindir proteínas, incluida apoA-I (la principal apolipoproteína HDL), péptido β amiloide y neuropéptido Y. Ver Liz, M.A. *et al.* (2010) *IUBMB Life*, 62(6):429-435.

La TTR es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas de 127 aminoácidos (monómeros) que son ricas en estructura de lámina beta. Cada monómero tiene dos láminas beta de 4 hebras y la forma de un elipsoide prolato. Interacciones de láminas beta antiparalelas unen a los monómeros para formar dímeros. Un bucle corto de cada monómero forma la principal interacción dímero-dímero. Estos dos pares de bucles separan las láminas betas opuestas convexas de los dímeros para formar un canal interno.

El hígado es el sitio principal de expresión de la TTR. Otros sitios importantes de expresión incluyen el plexo carotídeo, la retina (en particular el epitelio pigmentario retiniano) y el páncreas.

La transtiretina es uno de al menos 27 tipos distintos de proteínas que son proteínas precursoras en la formación de fibrillas amiloides. Ver Guan, J. *et al.* (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Corazón Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpcorazón.00815.2011. La acumulación extracelular de fibrillas amiloides en órganos y tejidos es el distintivo de la amiloidosis. Las fibrillas amiloides están compuestas por acumulaciones de proteínas plegadas incorrectamente, lo cual puede ser el resultado de la producción en exceso de proteínas precursoras de mutaciones específicas de las mismas. El potencial amiloidogénico de la TTR puede relacionarse con su extensa estructura de láminas beta; estudios cristalográficos por rayos X indican que ciertas mutaciones amiloidogénicas destabilizan la estructura tetramérica de la proteína. Ver, por ejemplo, Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11.

La amiloidosis es un término general para el grupo de enfermedades amiloides que se caracterizan por depósitos amiloides. Las enfermedades amiloides se clasifican en base a su proteína precursora; por ejemplo, el nombre comienza con "A" de amiloide y sigue con una abreviación de la proteína precursora. Por ejemplo, ATTR se refiere a transtiretina amiloidogénica. *Ibid.*

Existen numerosas enfermedades asociadas a la TTR, la mayoría de las cuales son enfermedades amiloides. La TTR de secuencia normal se asocia con la amiloidosis cardíaca en personas de edad avanzada y se denomina amiloidosis sistémica senil (ASS) (también denominada amiloidosis cardíaca senil (ACS) o amiloidosis cardíaca). La ASS a menudo viene acompañada de depósitos microscópicos en muchos otros órganos. La amiloidosis con TTR se manifiesta de varias formas. Cuando el sistema nervioso periférico se ve afectado más prominentemente, la enfermedad se denomina polineuropatía amiloidótica familiar (PAF). Cuando el corazón está implicado principalmente pero no el sistema nervioso, la enfermedad se denomina cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF). Un tercer tipo principal de amiloidosis con TTR es la amiloidosis leptomeníngea, también conocida como amiloidosis leptomeníngea o meningocerebrovascular, amiloidosis del sistema nervioso central (SNC) o amiloidosis de forma VII. Las mutaciones en la TTR también pueden provocar opacidades vítreas amiloidóticas, síndrome del túnel carpiano e hipertiroidismo eutiroides, que es una enfermedad no amiloidótica que se cree es secundaria a una mayor asociación de tiroxina con TTR debido a una molécula de TTR mutante con mayor afinidad por la tiroxina. Ver, por ejemplo, Moses *et al.* (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033.

Las proteínas amiloidogénicas anormales pueden heredarse o adquirirse a través de mutaciones somáticas. Guan, J. *et al.* (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Corazón Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpcorazón.00815.2011. La ATTR asociada a la transtiretina es la forma de amiloidosis sistémica hereditaria más frecuente. Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442. Las mutaciones en la TTR aceleran el proceso de formación amiloide de TTR y constituyen el factor de riesgo más importante para el desarrollo de ATTR. Se sabe que más de 85 variantes de TTR amiloidogénica provocan amiloidosis familiar sistémica. Las mutaciones de TTR a menudo provocan la acumulación amiloide sistémica, con participación particular del sistema nervioso central, aunque algunas mutaciones se asocian con cardiomiopatía u opacidades vítreas. *Ibid.*

La mutación V30M es la mutación de TTR más prevalente. Ver, por ejemplo, Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442. La mutación V122I es portada por el 3.9% de la población afroamericana y es la causa más común de CAF. Jacobson, D.R. *et al.* (1997) *N. Engl. J. Med.* 336 (7): 466-73. Se estima que la ASS afecta a más del 25% de la población mayor de 80. Westermarck, P. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (7): 2843-5. El documento WO 2011/056883 describe agentes de iARN de doble hebra que se dirigen a la transtiretina.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de tratamientos efectivos para enfermedades asociadas con la TTR.

Compendio

La invención está definida por las reivindicaciones. Se refiere a un agente de iARN de doble hebra que comprende una hebra sentido complementaria a una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región complementaria a parte de un ARNm que codifica transtiretina (TTR), en donde cada hebra tiene de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos, en donde dicho agente de iARN de hebra doble está representado por la fórmula (III): sentido: 5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3' antisentido: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' (III) en donde: i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1, en donde i es 0, j es 1; p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6; cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente; en donde cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos modificados; en donde cada n_p, n_p', n_q y n_q' representa independientemente un nucleótido saliente; XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos; en donde los nucleótidos Y contienen una modificación 2'-fluoro y los nucleótidos Y' contienen una modificación 2'-O-metilo; en donde dicho motivo YYY ocurre en las posiciones 9, 10 y 11 cuando la región dúplex tiene 21 nucleótidos; y en donde la hebra sentido está conjugada con al menos un ligando.

La presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, que se dirigen al gen de transtiretina (TTR). La presente divulgación también proporciona métodos para inhibir la expresión de TTR y métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto utilizando los agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, de la invención. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de agentes de iARN que comprenden modificaciones químicas particulares que muestran una habilidad superior para inhibir la expresión de TTR. Los agentes que incluyen un cierto patrón de modificaciones químicas (por ejemplo, un agente alternado) y un ligando se muestran en la presente como efectivos para silenciar la actividad del gen de la TTR. Adicionalmente, los agentes que incluyen uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluido uno de dichos motivos en o cerca del sitio de escisión de los agentes, muestran una actividad de silenciamiento del gen de la TTR sorprendentemente mejorada. Cuando en el agente está presente un motivo químico simple, es preferible que esté en o cerca de la región de escisión para mejorar la actividad de silenciamiento del gen. La región de escisión es la región alrededor del sitio de escisión, es decir, el sitio en el ARNm objetivo en el cual ocurre la escisión.

De esta forma, en un aspecto, la presente divulgación presenta agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, para inhibir la expresión de una transtiretina (TTR). El agente de iARN de doble hebra incluye una hebra sentido complementaria a una hebra antisentido. La hebra antisentido incluye una región complementaria a una parte de una transtiretina que codifica ARNm. Cada hebra tiene 14 a 30 nucleótidos y el agente de iARN de doble hebra se representa mediante la fórmula (III): sentido: 5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3' antisentido: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'

(III).

En la fórmula III, i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1; p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6; cada N_a y N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 0-25 nucleótidos que son modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, incluyendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de diferente forma; cada N_b y N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 0-10 nucleótidos que son modificados o no modificados o combinaciones de los mismos; cada n_p, n_p', n_q y n_q' independientemente representa un nucleótido saliente; cada XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' independientemente representa un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos; modificaciones en N_b difieren de la modificación en Y y modificaciones en N_b' difieren de la modificación en Y'. En algunas realizaciones, la hebra sentido se conjuga con al menos un ligando, por ejemplo, al menos un ligando, por ejemplo, al menos un ligando unido al extremo 3' de la hebra sentido. En otras realizaciones, el ligando puede conjugarse con la hebra antisentido.

En algunos casos, i es 1; j es 1; o tanto i como j son 1.

En algunos casos, k es 1; l es 1; o tanto k como l son 1.

Según la invención, i es 0; j es 1.

En algunos casos, i es 1, j es 0.

Según la invención, k es 0; l es 1.

En algunos casos, k es 1; l es 0.

En algunos casos, XXX es complementario a X'X'X', YYY es complementario a Y'Y'Y' y ZZZ es complementario a Z'Z'Z'.

En algunos casos, el motivo YYY se encuentra en o cerca del sitio de escisión de la hebra sentido.

5 En algunas realizaciones, el motivo Y'Y'Y' se encuentra en las posiciones 11, 12 y 13 de la hebra antisentido del extremo 5'.

Según la invención, el Y' es 2'-O-metilo.

En algunos casos, el Y' es 2'-fluoro.

10 En algunos casos, la fórmula (III) se representa como la fórmula (IIIa):
 sentido: 5' n_p $-N_a$ $-Y$ Y Y $-N_b$ $-Z$ Z Z $-N_a-n_q$ 3'
 antisentido: 3' $n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'n_q'$ 5'
 (IIIa).

En la fórmula IIIa, cada N_b y N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 1-5 nucleótidos modificados.

15 En algunas realizaciones, la fórmula (III) se representa como la fórmula (IIIb):
 sentido: 5' n_p-N_a-X X X $-N_b-Y$ Y Y $-N_a-n_q$ 3'
 antisentido: 3' $n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'$ 5'
 (IIIb).

En la fórmula IIIb cada N_b y N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 1-5 nucleótidos modificados.

20 En algunos casos, la fórmula (III) se representa como la fórmula (IIIc):
 sentido: 5' n_p-N_a-X X X $-N_b-Y$ Y Y $-N_b-Z$ Z Z $-N_a-n_q$ 3'
 antisentido: 3' $n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'$ 5'
 (IIIc).

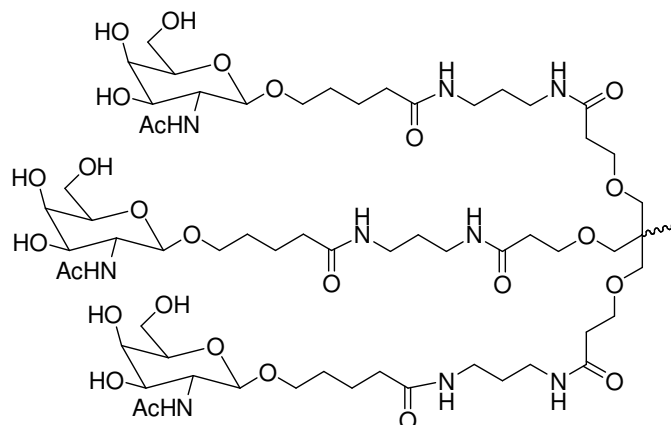
25 En la fórmula IIIc, cada N_b y $-N_b'$ independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 1-5 nucleótidos modificados y cada N_a y N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos incluidos 2-10 nucleótidos modificados.

En muchos casos, las regiones dúplex tienen 15-30 pares de nucleótidos de longitud. En algunos casos, la región de dúplex tiene 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-25 pares de nucleótidos de longitud, 23-27 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud.

30 En algunos casos, cada hebra tiene 15-30 nucleótidos.

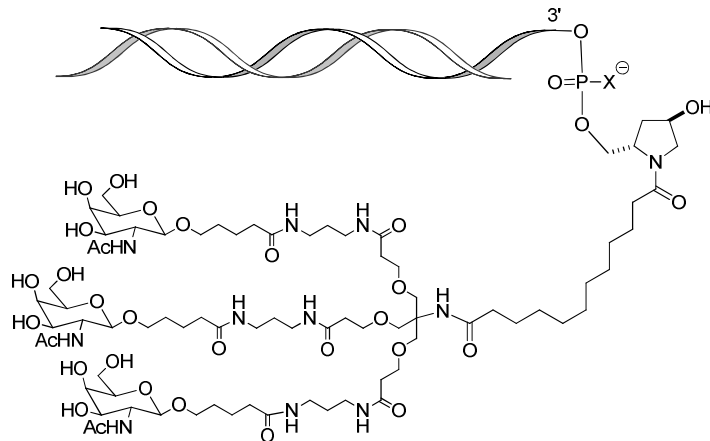
En algunos casos, las modificaciones en los nucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, 2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo y combinaciones de los mismos. En algunos casos preferidos, las modificaciones en los nucleótidos son 2'-O-metilo o 2'-fluoro.

35 En algunas realizaciones, el ligando es uno o más derivados de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unidos a través de un enlazante ramificado bivalente o trivalente. En realizaciones particulares, el ligando es



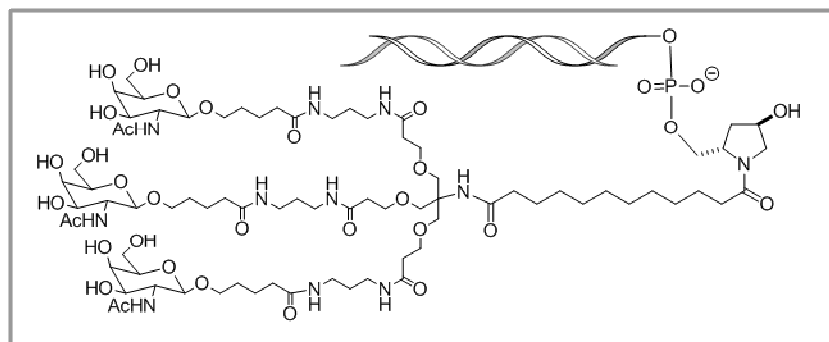
En algunas realizaciones, el ligando está unido al extremo 3' de la hebra sentido.

En algunas realizaciones, el agente de iARN se conjuga con el ligando tal como se muestra en el siguiente esquema



5 en donde X es O o S.

En algunas realizaciones, el agente de iARN se conjuga con el ligando tal como se muestra en el siguiente esquema



10 En algunos casos, el agente de iARN adicionalmente incluye al menos una conexión internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato. En algunos casos, la conexión internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato está en el extremo terminal 3' de una hebra. En algunos casos, la hebra es la hebra antisentido. En otros casos, la hebra es la hebra sentido.

En algunos casos, el par de bases en la posición 1 del extremo 5' del dúplex es un par de bases AU.

Según la invención, los nucleótidos Y contienen una modificación 2'-fluoro.

15 Según la invención, los nucleótidos Y' contienen una modificación 2'-O-metilo.

En algunos casos, $p' > 0$. En algunos de dichos casos, cada n es complementario al ARNm objetivo. En dichos otros casos, cada n es no complementario al ARNm objetivo. En algunos casos, p, p', q y q' son 1-6. En algunos casos preferidos, p' = 1 o 2. En algunos casos preferidos, p'=2. En algunos de dichos casos, q'=0, p=0, q=0 y los nucleótidos salientes p' son complementarios al ARNm objetivo. En dichos otros casos, q'=0, p=0, q=0 y los nucleótidos salientes p' son no complementarios al ARNm objetivo.

20 Según la invención, la hebra sentido tiene un total de 21 nucleótidos y la hebra antisentido tiene un total de 23 nucleótidos.

En algunos casos, conexiones entre n_p' incluyen conexiones de fosforotioato. En algunos de dichos casos, las conexiones entre n_p' son conexiones de fosforotioato.

25 En algunos casos, el agente de iARN se selecciona del grupo de agentes que figuran en la Tabla 1.

En casos preferidos, el agente de iARN se selecciona del grupo que consiste en AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547.

En un caso aun más preferido, el agente de iARN es AD-51547 que tiene la siguiente estructura:

5 sentido: 5'- UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfl96-3' (SEQ ID NO:2)
 antisentido: 5'- uCfuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc-3' (SEQ ID NO:3)

en donde los nucleótidos en minúscula (a, u, g, c) indican nucleótidos 2'-O-metilo; Nf (por ejemplo, Af) indica un nucleótido 2'-fluoro; s indica una conexión de fosfotiorato; L96 indica un ligando GalNAc₃.

En otro aspecto, la presente invención presenta una célula in vitro que contiene el agente de iARN para inhibir la expresión de TTR de la invención.

10 En un aspecto adicional, la presente invención presenta una composición farmacéutica que comprende un agente de iARN para inhibir la expresión de TTR de la invención. En algunos casos, la composición farmacéutica es una solución que comprende el agente de iARN. En algunas realizaciones, la solución que comprende el agente de iARN es una solución sin tamponar, por ejemplo, solución salina o agua. En otras realizaciones, la solución es una solución tamponadora, por ejemplo, una solución de solución salina tamponada con fosfato (PBS).
 15 realizaciones, la composición farmacéutica es un liposoma o una formulación lipídica. En algunos casos, la formulación lipídica comprende XTC o MC3.

En otro aspecto adicional, la presente invención presenta métodos in vitro para inhibir la expresión de transtiretina (TTR) en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en la célula, inhibiendo así la expresión de TTR en la célula.
 20

En algunas realizaciones, la expresión de TTR se inhibe al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90%.

25 Según la invención, la célula se pone en contacto in vitro con el agente de iARN. En otros casos, la célula está presente dentro de un sujeto. En casos preferidos, el sujeto es un humano.

En casos adicionales, el sujeto es un sujeto que padece una enfermedad asociada a TTR y la cantidad efectiva es una cantidad terapéuticamente efectiva. En otros casos, el sujeto es un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a TTR y la cantidad efectiva es una cantidad profilácticamente efectiva. En algunos casos, un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a TTR es un sujeto que porta un gen de la mutación de TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a TTR.
 30

En algunas realizaciones, la enfermedad asociada a TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (ASS), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (PAF), cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF), amiloidosis leptomeníngea/del Sistema Nervioso Central (SNC) e hipertiroxinemia.

35 En algunos casos, el sujeto tiene una amiloidosis asociada a TTR y el método reduce un depósito de TTR amiloide en el sujeto.

En otros casos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante un medio de administración que se selecciona del grupo que consiste en subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrabronquial, intrapleurar, intraperitoneal, intraarterial, linfática, cerebroespinal y cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante administración subcutánea o intravenosa. En casos preferidos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante administración subcutánea. En algunos de dichos casos, la administración subcutánea incluye administración mediante bomba subcutánea o depósito subcutáneo.
 40

En algunos casos, el agente de iARN se administra al sujeto de forma tal que el agente de iARN se libera en un sitio específico dentro del sujeto. En algunos casos, el sitio se selecciona del grupo que consiste en hígado, plexo coroideo, retina y páncreas. En casos preferidos, el sitio es el hígado. En algunos casos, la liberación del agente de iARN es mediada por el receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R) presente en hepatocitos.
 45

En algunos casos, el agente de iARN se administra a una dosis de entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 0.5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, o entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.
 50

- En algunos casos, el agente de iARN se administra a una dosis de aproximadamente 0.25 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 21 mg/kg, aproximadamente 22 mg/kg, aproximadamente 23 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 33 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg.
- En algunos casos, el agente de iARN se administra en dos o más dosis. En realizaciones particulares, el agente de iARN se administra a intervalos que se seleccionan del grupo que consiste en una vez cada aproximadamente 2 horas, una vez cada aproximadamente 3 horas, una vez cada aproximadamente 4 horas, una vez cada aproximadamente 6 horas, una vez cada aproximadamente 8 horas, una vez cada aproximadamente 12 horas, una vez cada aproximadamente 24 horas, una vez cada aproximadamente 48 horas, una vez cada aproximadamente 72 horas, una vez cada aproximadamente 96 horas, una vez cada aproximadamente 120 horas, una vez cada aproximadamente 144 horas, una vez cada aproximadamente 168 horas, una vez cada aproximadamente 240 horas, una vez cada aproximadamente 336 horas, una vez cada aproximadamente 504 horas, una vez cada aproximadamente 672 horas y una vez cada aproximadamente 720 horas.
- En otros casos, el método adicionalmente incluye evaluar el nivel de expresión de ARNm de TTR o expresión de proteína TTR en una muestra derivada del sujeto.
- En casos preferidos, la administración del agente de iARN no resulta en una respuesta inflamatoria en el sujeto tal como se evalúa en base al nivel de una citoquina o quimioquina seleccionada del grupo que consiste en G-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p70), IL1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α y cualquier combinación de las mismas, en una muestra del sujeto.
- En algunos casos, el agente de iARN se administra utilizando una composición farmacéutica.
- En casos preferidos, el agente de iARN se administra en una solución. En algunos de dichos casos, el ARNip se administra en una solución sin tamponar. En un caso, el ARNip se administra en agua. En otros casos, el ARNip se administra con una solución tamponadora, tal como un tampón de acetato, un tampón de citrato, un tampón de prolamina, un tampón de carbonato, o un tampón de fosfato o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la solución tamponadora es solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- En otro caso, la composición farmacéutica es un liposoma o una formulación lipídica que comprende SNALP o XTC. En un caso, la formulación lipídica comprende un MC3.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva o cantidad profilácticamente efectiva de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, tratando o previniendo así la enfermedad asociada a TTR en el sujeto.
- En algunos casos, la expresión de TTR en una muestra derivada del sujeto se inhibe al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60% o al menos aproximadamente 70% al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90%.
- En algunos casos, el sujeto es un humano.
- En algunos casos, el sujeto es un sujeto que padece una enfermedad asociada a TTR. En otros casos, el sujeto es un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a TTR.
- En algunos casos, el sujeto es un sujeto que porta un gen de la mutación de TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a TTR.
- En algunas realizaciones, la enfermedad asociada a TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (ASS), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (PAF), cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF), amiloidosis leptomeníngea/del Sistema Nervioso Central (SNC) e hipertiroxinemia.
- En algunos casos, el sujeto tiene una amiloidosis asociada a TTR y el método reduce un depósito de TTR amiloide en el sujeto.

5 En algunos casos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante un medio de administración que se selecciona del grupo que consiste en subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrabronquial, intrapleurales, intraperitoneal, intraarterial, linfática, cerebroespinal y cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante administración subcutánea o intravenosa. En casos preferidos, el agente de iARN se administra al sujeto mediante administración subcutánea. En algunos de dichos casos, la administración subcutánea incluye administración mediante bomba subcutánea o depósito subcutáneo.

10 En algunos casos, el agente de iARN se administra al sujeto de forma tal que el agente de iARN se libera en un sitio específico dentro del sujeto. En algunos de dichos casos, el sitio se selecciona del grupo que consiste en hígado, plexo coroideo, retina y páncreas. En casos preferidos, el sitio es el hígado. En algunos casos, la liberación del agente de iARN es mediada por el receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) presente en hepatocitos.

15 En algunos casos, el agente de iARN se administra a una dosis de entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 0.5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, o entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

20 En algunos casos, el agente de iARN se administra a una dosis de aproximadamente 0.25 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 21 mg/kg, aproximadamente 22 mg/kg, aproximadamente 23 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 33 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg.

35 En algunos casos, el agente de iARN se administra en dos o más dosis. En realizaciones particulares, el agente de iARN se administra a intervalos que se seleccionan del grupo que consiste en una vez cada aproximadamente 2 horas, una vez cada aproximadamente 3 horas, una vez cada aproximadamente 4 horas, una vez cada aproximadamente 6 horas, una vez cada aproximadamente 8 horas, una vez cada aproximadamente 12 horas, una vez cada aproximadamente 24 horas, una vez cada aproximadamente 48 horas, una vez cada aproximadamente 72 horas, una vez cada aproximadamente 96 horas, una vez cada aproximadamente 120 horas, una vez cada aproximadamente 144 horas, una vez cada aproximadamente 168 horas, una vez cada aproximadamente 240 horas, una vez cada aproximadamente 336 horas, una vez cada aproximadamente 504 horas, una vez cada aproximadamente 672 horas y una vez cada aproximadamente 720 horas.

En otros casos, el método adicionalmente incluye evaluar el nivel de expresión de ARNm de TTR o expresión de proteína TTR en una muestra derivada del sujeto.

45 En casos preferidos, la administración del agente de iARN no resulta en una respuesta inflamatoria en el sujeto tal como se evalúa en base al nivel de una citoquina o quimioquina seleccionada del grupo que consiste en G-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p70), IL1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α y cualquier combinación de las mismas, en una muestra del sujeto.

En algunos casos, el agente de iARN se administra utilizando una composición farmacéutica, por ejemplo, un liposoma.

50 En algunos casos, el agente de iARN se administra en una solución. En algunos de dichos casos, el ARNiP se administra en una solución sin tamponar. En un caso, el ARNiP se administra en solución salina o agua. En otros casos, el ARNiP se administra con una solución tamponadora, tal como un tampón de acetato, un tampón de citrato, un tampón de prolamina, un tampón de carbonato, o un tampón de fosfato o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, la solución tamponadora es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la expresión de transtiretina (TTR) en una célula que incluye poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en la célula. En un aspecto, el agente de

iARN de doble hebra se selecciona del grupo de agentes que figuran en la Tabla 1, inhibiendo así la expresión de transtiretina (TTR) en la célula.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la expresión de transtiretina (TTR) en una célula que incluye poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en la célula. En un aspecto, el agente de iARN de doble hebra se selecciona del grupo que consiste en AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547, inhibiendo así la expresión de transtiretina (TTR) en la célula.

10 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad profilácticamente efectiva de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra. En un aspecto, el agente de iARN de doble hebra se selecciona del grupo de agentes que figuran en la Tabla 1, tratando o previniendo así una enfermedad asociada a TTR en el sujeto.

15 En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad profilácticamente efectiva de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra. En un aspecto, el agente de iARN de doble hebra se selecciona del grupo que consiste en AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547, tratando o previniendo así una enfermedad asociada a TTR en el sujeto.

20 En aspectos adicionales, la divulgación proporciona kits para llevar a cabo los métodos de la invención. En un aspecto, la divulgación proporciona un kit para llevar a cabo un método para inhibir la expresión de transtiretina (TTR) en una célula que comprende poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de dicha TTR en dicha célula, inhibiendo así la expresión de TTR en la célula. El kit comprende un agente de iARN e instrucciones para su uso y, opcionalmente, medios para administrar el agente de iARN al sujeto.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la siguiente descripción detallada y los dibujos.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una gráfica que ilustra que administrar a ratones una sola dosis subcutánea de un agente de iARN conjugado con GalNAc que se dirige a TTR resultó en una supresión dependiente de la dosis de ARNm de TTR.

30 La Figura 2 es una gráfica que ilustra que administrar a ratones una sola dosis subcutánea de 7.5 mg/kg o 30 mg/kg de un agente de iARN conjugado con GalNAc que se dirige a TTR resultó en una supresión de larga duración de ARNm de TTR.

La Figura 3 ilustra la secuencia de ARNm de TTR humana.

La Figura 4 es una gráfica que ilustra la actividad de silenciamiento mejorada de agentes de iARN modificados con respecto al AD-45163 base.

35 La Figura 5 es una gráfica que ilustra la actividad de silenciamiento mejorada de agentes de iARN modificados con respecto al AD-45165 base.

La Figura 6 es una gráfica que ilustra el silenciamiento de captación libre mejorada tras la incubación de 4 horas con agentes de iARN modificados con respecto al AD-45163 base.

La Figura 7 es una gráfica que ilustra el silenciamiento de captación libre mejorada tras la incubación de 24 horas con agentes de iARN modificados con respecto al AD-45163 base.

40 La Figura 8 es una gráfica que ilustra el silenciamiento de captación libre mejorada tras la incubación de 4 horas con agentes de iARN modificados con respecto al AD-45165 base.

La Figura 9 es una gráfica que ilustra el silenciamiento de captación libre mejorada tras la incubación de 24 horas con agentes de iARN modificados con respecto al AD-45165 base.

45 La Figura 10 es una gráfica que ilustra el silenciamiento de ARNm de TTR en ratones transgénicos que expresan V30M de TTRh tras la administración de una sola dosis subcutánea de agentes de iARN AD-51544, AD-51545, AD-45163, AD-51546, AD-51547 o AD-45165.

La Figura 11 es una gráfica que ilustra la supresión de la proteína TTR en ratones transgénicos que expresan V30M de TTRh tras la administración de una sola dosis subcutánea de 5 mg/kg o 1mg/kg de agentes de iARN AD-51544, AD-51545 o AD-45163.

La Figura 12 es una gráfica que ilustra la supresión de la proteína TTR en ratones transgénicos que expresan V30M de TTRh tras la administración de una sola dosis subcutánea de 5 mg/kg o 1mg/kg de agentes de iARN AD-51546, AD-51547 o AD-45165.

5 La Figura 13 ilustra el protocolo para extracciones de sangre post-dosis en monos que recibieron 5x5mg/kg de agente de iARN (línea superior) o 1x25 mg/kg de agente de iARN (línea inferior).

La Figura 14 es una gráfica que ilustra la supresión de la proteína TTR en primates no humanos tras la administración subcutánea de cinco dosis de 5 mg/kg (panel superior) o una sola dosis de 25 mg/kg (panel inferior) de AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 o AD-51547.

10 La Figura 15 es una gráfica que ilustra la supresión de la proteína TTR en primates no humanos tras la administración subcutánea de AD-51547 a 2.5 mg/kg (cuadrados blancos), 5 mg/kg (cuadrados negros) o 10 mg/kg (cuadrados estampados) por dosis, o administración de PBS como un testigo negativo (cuadrados grises).

Descripción detallada

15 La presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, y composiciones que se dirigen al gen de la transtiretina (TTR). La presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión de TTR y métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto que utiliza los agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, de la invención. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que agentes de iARN que comprenden modificaciones químicas particulares muestran una capacidad superior para inhibir la expresión de TTR. Los agentes que incluyen un cierto patrón de modificaciones químicas (por ejemplo, un patrón alterno) y un ligando demostraron en la presente ser
20 efectivos en silenciar la actividad del gen de la TTR. Más aun, los agentes que incluyen uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo uno de dichos motivos en o cerca del sitio de escisión de los agentes, muestran sorprendentemente la actividad silenciadora del gen de la TTR mejorada. Cuando un solo motivo químico está presente en el agente, se prefiere que esté en o cerca de la región de escisión para mejorar la actividad de silenciamiento de genes. La región de escisión es la región que rodea el sitio de escisión, es decir, el sitio en el ARNm objetivo en el cual ocurre la escisión.
25

I. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado al mismo en esta sección.

30 La expresión "que incluye" se utiliza en la presente para referirse a la frase "que incluye a modo no taxativo" y se utiliza de manera intercambiable con ésta.

El término "o" se utiliza en la presente para referirse al término "y/o", y se utiliza de manera intercambiable con éste, a menos que el contexto indique lo contrario.

35 Tal como se utiliza en la presente, una "transtiretina" ("TTR") se refiere al gen y la proteína bien conocidos. TTR también se conoce como prealbúmina, HsT2651, PALB y TBPA. La TTR funciona como transportador de la proteína de unión a retinol (RBP), tiroxina (T4) y retinol y también actúa como una proteasa. El hígado secreta TTR en la sangre y el plexo coroideo secreta TTR en el fluido cerebroespinal. La TTR también se expresa en el páncreas y el epitelio de pigmento retinal. La mayor relevancia clínica de la TTR es que la proteína TTR normal y mutante puede formar fibrillas amiloides que se acumulan en depósitos extracelulares, provocando amiloidosis. Ver una reseña, por ejemplo, en Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11. La clonación molecular y la
40 secuencia de nucleótidos de transtiretina de rata, así como la distribución de la expresión de ARNm, fueron descritas por Dickson, P.W. et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260(13):8214-8219. La estructura de cristal de rayos X de TTR humana se describió en Blake, C.C. et al. (1974) *J Mol Biol* 88, 1-12. La secuencia de un transcrito de ARNm de TTR humana puede encontrarse en el número de acceso RefSeq NM_000371 del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). La secuencia de ARNm de TTR de ratón puede encontrarse en el número de acceso de
45 RefSeq NM_013697.2, y la secuencia de ARNm de TTR de rata puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq NM_012681.1.

Tal como se utiliza en la presente, "secuencia objetivo" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen de la TTR, incluyendo ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

50 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia denominada utilizando la nomenclatura de nucleótidos estándar.

"G," "C," "A" y "U" cada uno significa generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como una base, respectivamente. "T" y "dT" se utilizan de manera intercambiable en la presente y se refieren a un desoxirribonucleótido en donde la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina, 2'-desoxitimidina o timidina.
55

Sin embargo, se comprenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también puede referirse a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente a continuación, o un resto de reemplazo sustituto. El experto en la técnica es bien consciente de que la guanina, citosina, adenina y uracilo pueden reemplazarse por otros restos sin alterar básicamente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que tiene dicho resto de reemplazo. Por ejemplo, a modo no taxativo, un nucleótido que comprende inosina como su base puede aparearse con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden reemplazarse en las secuencias de nucleótidos de la invención mediante un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Se consideran secuencias que comprenden dichos restos de reemplazo.

5 Un "agente de iARN de doble hebra", una molécula de ARN de doble hebra (ARNdh), también denominado "agente de ARNdh", "ARNdh", "ARNip", "agente de ARNi", tal como se utiliza de forma intercambiable en la presente, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico que tiene una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y básicamente complementarias, como se define a continuación. En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en la presente, cada una de las hebras o ambas pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "agente de iARN" puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente de iARN puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Dichas modificaciones pueden incluir todo tipo de modificaciones divulgadas en la presente o conocidas en la técnica. Cualquiera de dichas modificaciones, tal como se utilizan en una molécula de tipo ARNip, abarcan el "agente de iARN".

10 En otro caso, el agente de iARN puede ser un ARNip de una sola hebra que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm objetivo. Agentes de iARN de una sola hebra se unen a la endonucleasa Argonauta 2 de RISC, que escinde entonces el ARNm objetivo. Los ARNip de una sola hebra son generalmente 15-30 nucleótidos y están químicamente modificados. El diseño y la evaluación de los ARNip de una sola hebra se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 8,101,348 y en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente pueden utilizarse como un ARNip de una sola hebra como se describe en la presente o químicamente modificadas por los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

15 Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos hebras son parte de una molécula más grande y de este modo están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina un "bucle de horquilla". Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios diferentes a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la estructura de conexión se denomina un "enlazante". Las hebras de ARN pueden tener el mismo o un diferente número de nucleótidos. El número máximo de pares de base es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNdh menos cualquier saliente presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un agente de iARN puede comprender una o más salientes de nucleótido. El término "ARNip" también se utiliza en la presente para referirse a un agente de iARN como se describió anteriormente.

20 En otro aspecto, el agente es una molécula de ARN antisentido de una sola hebra. Una molécula de ARN antisentido es complementaria a una secuencia dentro del ARNm objetivo. El ARN antisentido puede inhibir la traducción de un modo estequiométrico mediante apareamiento de bases al ARNm y mediante la obstrucción física de la máquina de traducción, ver Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. La molécula de ARN antisentido puede tener aproximadamente 15-30 nucleótidos que son complementarios al ARNm objetivo. Por ejemplo, la molécula de ARN antisentido puede tener una secuencia de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias antisentido de la Tabla 1.

25 Tal como se utiliza en la presente, una "saliente de nucleótidos" se refiere a un nucleótido o nucleótidos no apareados que sobresalen de la estructura de dúplex de un agente de iARN cuando un extremo de una hebra del agente de iARN se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos no apareados en ese extremo del agente de iARN de doble hebra, es decir, ninguna saliente de nucleótidos. Un agente de iARN de "extremo romo" es un ARNdh que es de doble hebra sobre su longitud entera, es decir, ninguna saliente de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes de iARN de la invención incluyen agentes de iARN con salientes de nucleótidos en un extremo (es decir, agentes con una saliente y un extremo romo) o con salientes de nucleótidos en ambos extremos.

30 La expresión "hebra antisentido" se refiere a la hebra de un agente de iARN de doble hebra que incluye una región que es básicamente complementaria a una secuencia objetivo (por ejemplo, un ARNm de TTR humana). Tal como se utiliza en la presente, la expresión "región complementaria a parte de un ARNm que codifica transtiretina" se refiere a una región en la hebra antisentido que es básicamente complementaria a parte de una secuencia de ARNm de TTR. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia objetivo, los apareamientos incorrectos se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

La expresión "hebra sentido", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la hebra de ARNdh que incluye una región que es básicamente complementaria a una región de la hebra antisentido.

5 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "región de escisión" se refiere a una región que se ubica inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio en el cual ocurre la escisión. En algunos casos, la región escindible comprende tres bases en cualquier extremo de, e inmediatamente adyacente al sitio de escisión. En algunas realizaciones, la región escindible comprende dos bases en cualquier extremo de, e inmediatamente adyacente al sitio de escisión. En algunos casos, el sitio de escisión se encuentra específicamente en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la hebra antisentido, y la región escindible comprende nucleótidos los 11, 12 y 13.

10 Tal como se utiliza en la presente, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se utiliza para describir una primera secuencia de nucleótidos con relación a una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura de dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como comprenderá un experto en la técnica. Dichas condiciones pueden, por ejemplo, ser condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: 400 mM de NaCl, 15 40 mM de PIPES pH 6.4, 1 mM de EDTA, 50°C o 70°C durante 12-16 horas tras un lavado. Otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes como las que pueden encontrarse dentro de un organismo, pueden aplicarse. Un experto en la técnica será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la última aplicación de los nucleótidos hibridados.

20 Las secuencias puede ser "completamente complementarias" con respecto a la otra cuando hay apareamiento de bases de los nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos con los nucleótidos de la segunda secuencia de nucleótidos en la longitud total de la primera y la segunda secuencia de nucleótidos. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "básicamente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en la presente, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias o pueden formar una o más, pero 25 generalmente no más de 4, 3 o 2, pares de bases no coincidentes tras la hibridación, reteniendo a la vez la capacidad de hibridarse en las condiciones más relevantes a su última aplicación. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, una o más salientes de una sola hebra, tales salientes no deberán considerarse como apareamientos incorrectos con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNdh que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 30 nucleótidos de largo, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, puede igualmente denominarse "completamente complementaria" a los efectos descritos en la presente.

35 Secuencias "complementarias", tal como se utiliza en la presente, también pueden incluir, o formarse completamente de, pares de bases no Watson-Crick y/o pares de bases formados de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida en que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse. Dichos pares de bases no Watson-Crick incluyen, a modo no taxativo, apareamiento de bases de balanceo G-U o Hoogsteen.

40 Las expresiones "complementaria", "completamente complementaria" y "básicamente complementaria" en la presente pueden utilizarse con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un ARNdh, o entre la hebra antisentido de un ARNdh y una secuencia objetivo, como se comprenderá del contexto de su uso.

45 Tal como se utiliza en la presente, un polinucleótido que es "básicamente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es básicamente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, una ARNm que codifica TTR) incluyendo una UTR 5', un marco de lectura abierto (ORF) o una UTR 3'. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de TTR si la secuencia es básicamente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica TTR.

La expresión "que inhibe", tal como se utiliza en la presente, se utiliza de manera intercambiable con "que reduce", "que silencia", "que regula hacia abajo", "que suprime" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

50 La frase "expresión inhibidora de una TTR", tal como se utiliza en la presente, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen de la TTR (tal como, por ejemplo, un gen de la TTR de ratón, un gen de la TTR de rata, un gen de la TTR de mono o un gen de la TTR de humano) así como variantes o mutantes de un gen de la TTR. Por lo tanto, el gen de la TTR puede ser un gen de la TTR natural, un gen de la TTR mutante (tal como un gen de la TTR mutante que dio lugar a deposición amiloide sistémica) o un gen de la TTR transgénico en el contexto de una célula, grupo de células, u organismos genéticamente manipulados.

55 "Expresión de inhibición de un gen de la TTR" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de la TTR, por ejemplo, al menos supresión parcial de la expresión de un gen de la TTR, tal como una inhibición de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos

aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos
 aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos
 aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos
 aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos
 5 aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos
 aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos
 aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%.

La expresión de un gen de la TTR puede evaluarse en base al nivel de cualquier variable asociada con la expresión del gen de la TTR, por ejemplo, nivel del ARNm de la TTR, nivel de proteína de la TTR, nivel de la proteína de unión a retinol, nivel de vitamina A, o el número o alcance de los depósitos amiloides. La inhibición puede evaluarse mediante una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación con un nivel testigo. El nivel testigo puede ser cualquier tipo de nivel testigo que se utiliza en la técnica, por ejemplo, un nivel de base de pre-dosis o un nivel determinado de un sujeto similar, célula o muestra que es tratada o no tratada con un testigo (tal como, por ejemplo, testigo sólo con solución amortiguadora o testigo de agente inactivo).

La frase "poner en contacto una célula con un agente de iARN", tal como se utiliza en la presente, incluye poner en contacto una célula mediante cualquier medio posible. Poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra incluye poner en contacto una célula in vitro con el agente de iARN o poner en contacto una célula in vivo con el agente de iARN. El hecho de poner en contacto puede realizarse directamente o indirectamente. Por lo tanto, por ejemplo, el agente de iARN se puede poner en contacto físico con la célula por el individuo que realiza el método, o alternativamente, el agente de iARN se puede poner en una situación que permitirá o causará que se ponga en contacto posteriormente con la célula.

El hecho de poner en contacto una célula in vitro puede realizarse, por ejemplo, mediante la incubación de la célula con el agente de iARN. El hecho de poner en contacto una célula in vivo puede realizarse, por ejemplo, mediante la inyección del agente de iARN en o cerca del tejido donde está ubicada la célula, o mediante la inyección del agente de iARN en otra área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de modo que el agente alcanzará posteriormente el tejido donde se encuentra la célula que se pondrá en contacto. Por ejemplo, el agente de iARN puede contener y/o estar acoplado a un ligando, por ejemplo, un ligando GalNAc₃, que dirige el agente de iARN a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También son posibles combinaciones de métodos para poner en contacto in vitro e in vivo. En conexión con los métodos de la invención, una célula podría ponerse en contacto in vitro con un agente de iARN y posteriormente trasplantarse en un sujeto.

Un "paciente" o "sujeto" tal como se utiliza en la presente, pretende incluir un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un mono. Más preferiblemente, el sujeto o paciente es un humano.

Una "enfermedad asociada a TTR", tal como se utiliza en la presente, pretende incluir cualquier enfermedad asociada con el gen o proteína TTR. Dicha enfermedad puede ser causada, por ejemplo, mediante la producción en exceso de la proteína TTR, mediante mutaciones del gen de la TTR, mediante escisión anormal de la proteína TTR, mediante interacciones anormales entre TTR y otras proteínas u otras sustancias endógenas o exógenas. Una "enfermedad asociada a TTR" incluye cualquier tipo de amiloidosis por TTR (ATTR) en donde la TTR juega un rol en la formación de agregados extracelulares anormales o depósitos amiloides. Las enfermedades asociadas a TTR incluyen amiloidosis sistémica senil (ASS), amiloidosis sistémica familiar, polineuropatía amiloidótica familiar (PAF), cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF), amiloidosis leptomenígea/del Sistema Nervioso Central (SNC), opacidades vítreas amiloidóticas, síndrome del túnel carpiano e hipertiroxinemia. Síntomas de amiloidosis por TTR incluyen neuropatía sensorial (por ejemplo, parestesia, hipoestesia en miembros distales), neuropatía autonómica (por ejemplo, disfunción gastrointestinal, tal como úlcera gástrica, o hipotensión ortostática), neuropatía motora, crisis, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, IMCm (Índice de Masa Corporal modificado) sustancialmente reducido, disfunción de los nervios craneales y distrofia corneal reticular.

"Cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se utiliza en la presente, pretende incluir la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad asociada a TTR, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, disminuyendo, aliviando o manteniendo la enfermedad existente o uno o más síntomas de enfermedad). La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede variar dependiendo del agente de iARN, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y el antecedente, edad, peso, antecedente familiar, conformación genética, etapa de procesos patológicos mediados por la expresión de TTR, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si existieron, y otras características individuales del paciente a tratar.

"Cantidad profilácticamente efectiva", tal como se utiliza en la presente, pretende incluir la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administra a un sujeto que no experimenta o presenta síntomas de una enfermedad asociada a TTR, pero que puede estar predispuesto a la enfermedad, es suficiente para prevenir o aliviar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. Síntomas que pueden aliviarse incluyen neuropatía sensorial (por ejemplo, parestesia, hipoestesia en miembros distales), neuropatía autonómica (por ejemplo, disfunción gastrointestinal, tal como úlcera gástrica, o hipotensión ortostática), neuropatía motora, crisis, demencia, mielopatía, polineuropatía,

síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, IMCm (Índice de Masa Corporal modificado) sustancialmente reducido, disfunción de los nervios craneales y distrofia corneal reticular. Aliviar la enfermedad incluye ralentizar el curso de la enfermedad o reducir la gravedad de una enfermedad desarrollada posteriormente. La "cantidad profilácticamente efectiva" puede variar dependiendo del agente de iARN, cómo se administra el agente, el grado de riesgo de enfermedad, y el antecedente, edad, peso, antecedente familiar, conformación genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si existieron, y otras características individuales del paciente a tratar.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad profilácticamente efectiva" también incluye una cantidad de un agente de iARN que produce algo de efecto local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable para cualquier tratamiento. Los agentes de iARN empleados en los métodos de la presente invención pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

El término "muestra", tal como se utiliza en la presente, incluye una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosas, plasma, fluido cerebroespinal, fluidos oculares, linfa, orina, saliva y similares. Muestras tisulares pueden incluir muestras de tejidos, órganos o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar de órganos particulares, partes de órganos o fluidos o células dentro de aquellos órganos. En ciertas realizaciones, las muestras pueden derivar del hígado (por ejemplo, hígado entero o ciertos segmentos del hígado o ciertos tipos de células en el hígado, tales como, por ejemplo, hepatocitos), la retina o partes de la retina (por ejemplo, epitelio de pigmento retinal), el sistema nervioso central o partes del sistema nervioso central (por ejemplo, ventrículos o plexo coroideo), o el páncreas o ciertas células o partes del páncreas. En algunos casos, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a fluido cerebroespinal obtenido del sujeto. En realizaciones preferidas, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a sangre o plasma extraído del sujeto. En casos adicionales, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a tejido del hígado (o subcomponentes del mismo) o tejido retinal (o subcomponentes del mismo) derivado del sujeto.

II. Agentes de iARN

La presente divulgación proporciona agentes de iARN con actividad de silenciamiento de genes superior. Se muestra en la presente y en la Solicitud provisional No. 61/561,710 (de la cual la presente solicitud reivindica prioridad) que puede obtenerse un resultado superior mediante la introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en una hebra sentido y/o hebra antisentido de un agente de iARN, particularmente en o cerca del sitio de escisión. La hebra sentido y la hebra antisentido del agente de iARN puede de otro modo modificarse completamente. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la hebra sentido y/o antisentido. El agente de iARN también se conjuga opcionalmente con un ligando derivado GalNAc, por ejemplo en la hebra sentido. Los agentes de iARN resultantes presentan una actividad silenciadora de genes superior.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que cuando la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de iARN se modifican completamente, tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de al menos una hebra de un agente de iARN mejoró superiormente la actividad silenciadora de genes del agente de iARN.

Por consiguiente, la divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, capaces de inhibir la expresión de un gen objetivo (es decir, un gen de la TTR) in vivo. El agente de iARN comprende una hebra sentido y una hebra antisentido. Cada hebra del agente de iARN puede estar en el rango de 12-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede tener de entre 14-30 nucleótidos de longitud, 17-30 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 17-23 nucleótidos de longitud, 17-21 nucleótidos de longitud, 17-19 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud o 21-23 nucleótidos de longitud.

La hebra sentido y la hebra antisentido típicamente forman un ARN de doble hebra dúplex ("ARNdh"), también denominado en la presente un "agente de iARN". La región de dúplex de un agente de iARN puede tener de 12-30 pares de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la región de dúplex puede tener 14-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-30 pares de nucleótidos de longitud, 27-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-21 pares de nucleótidos de longitud, 17-19 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región de dúplex se selecciona de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

En un caso, el agente de iARN puede contener una o más regiones salientes y/o grupos protectores del agente de iARN en el extremo 3' o extremo 5' o ambos extremos de una hebra. La saliente puede ser de 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud o 1-2 nucleótidos de longitud. Las salientes pueden ser el resultado de una hebra que es más larga que la otra o el

resultado de dos hebras de la misma longitud que son escalonadas. La saliente puede formar un apareamiento incorrecto con el ARNm objetivo o puede ser complementaria a las secuencias del gen al que se dirige o puede ser otra secuencia. La primera y segunda hebra también pueden unirse, por ejemplo, mediante bases adicionales para formar una horquilla o mediante otros enlazantes no base.

- 5 Los agentes de iARN proporcionados por la presente invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/561,710, presentada el 18 de noviembre de 2011, Solicitud internacional No. PCT/US2011/051597, presentada el 15 de setiembre de 2010, y Publicación PCT WO 2009/073809.

10 En un caso, los nucleótidos en la región saliente del agente de iARN pueden ser cada uno independientemente un nucleótido modificado o sin modificar incluyendo, a modo no taxativo 2'-modificado por azúcar, tal como, 2-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitosina (m5Ceo) y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia saliente para cualquier extremo en cualquier hebra. La saliente puede formar un apareamiento incorrecto con el ARNm objetivo o puede ser complementaria a las secuencias del gen al que se dirige o puede ser otra secuencia.

15 Las salientes 5' o 3' en la hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras del agente de iARN pueden fosforilarse. En algunos casos, la región saliente contiene dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, donde los dos nucleótidos pueden ser el mismo o diferente. En un caso, la saliente está presente en el extremo 3' de la hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras. En una realización, esta saliente 3' está presente en la hebra antisentido. En una realización, esta saliente 3' está presente en la hebra sentido.

20 El agente de iARN puede contener sólo una sola saliente, que puede fortalecer la actividad de interferencia de la iARN, sin afectar su estabilidad general. Por ejemplo, la saliente de una sola hebra se ubica en el extremo 3' terminal de la hebra sentido o, alternativamente, en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido. La iARN también puede tener un extremo romo, ubicado en el extremo 5' de la hebra antisentido (o el extremo 3' de la hebra sentido) o viceversa. Generalmente, la hebra antisentido de la iARN tiene una saliente de nucleótido en el extremo 3' y el extremo 5' es romo. Si bien los solicitantes no pretenden ceñirse a teoría alguna, el mecanismo teórico es que el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la hebra antisentido y una saliente del extremo 3' de la hebra antisentido favorecen la carga de la hebra guía en el proceso RISC.

25 En un caso, el agente de iARN es un oligonucleótido de dos extremos romos de 19 nt de longitud, en donde la hebra sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

30 En un caso, el agente de iARN es un oligonucleótido de dos extremos romos de 20 nt de longitud, en donde la hebra sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

35 En un caso, el agente de iARN es un oligonucleótido de dos extremos romos de 21 nt de longitud, en donde la hebra sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

40 En un caso, el agente de iARN comprende una hebra sentido de 21 nucleótidos (nt) y una hebra antisentido de 23 nucleótidos (nt), en donde la hebra sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9,10,11 del extremo 5'; la hebra antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5', en donde un extremo del agente de iARN es romo, mientras el otro extremo comprende una saliente de 2 nt. Preferiblemente, la saliente de 2 nt está en el extremo 3' de la antisentido. Opcionalmente, el agente de iARN comprende además un ligando (preferiblemente GaINAc₃).

45 En un caso, el agente de iARN comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra sentido es de 25-30 residuos de nucleótido de longitud, en donde comenzando en el nucleótido terminal 5' (posición 1) las posiciones 1 a 23 de la primera hebra comprenden al menos 8 ribonucleótidos; la hebra antisentido es de 36-66 residuos de nucleótidos de longitud y, comenzando en el nucleótido terminal 3', comprende al menos 8 ribonucleótidos en las posiciones apareadas con las posiciones 1- 23 de la hebra sentido para formar un dúplex; en donde al menos el nucleótido terminal 3' de la hebra antisentido no está apareado con la hebra sentido, y hasta 6 nucleótidos terminales 3' consecutivos no están apareados con la hebra sentido, formando así una saliente de una sola hebra 3' de 1-6 nucleótidos; en donde el extremo 5' de la hebra antisentido comprende de 10-30 nucleótidos consecutivos que no están apareados con la hebra sentido, formando así una saliente 5' de una sola hebra de 10-30 nucleótidos; en donde al menos los nucleótidos de 5' terminal y 3' terminal de la hebra sentido se aparean en bases con nucleótidos de la hebra antisentido cuando las hebras sentido y antisentido están alineadas para una complementariedad máxima, formando así una región sustancialmente de dúplex entre las hebras sentido y

antisentido; y la hebra antisentido es suficientemente complementaria a un ARN objetivo junto con al menos 19 ribonucleótidos de la longitud de la hebra antisentido para reducir la expresión de genes objetivo cuando el ácido nucleico de doble hebra se introduce en una célula de mamífero; y en donde la hebra sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos, donde al menos uno de los motivos se encuentra en o cerca del sitio de escisión. La hebra antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión.

En un caso, el agente de iARN comprende hebras sentido y antisentido, en donde el agente de iARN comprende una primera hebra que tiene una longitud que es al menos 25 y a lo sumo 29 nucleótidos y una segunda hebra que tiene una longitud que es a lo sumo 30 nucleótidos con al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en la posición 11,12,13 del extremo 5'; en donde el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra forman un extremo romo y la segunda hebra es 1-4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera hebra, en donde la región de dúplex que es de al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda hebra es suficientemente complementaria a un ARNm objetivo junto al menos 19 nt de la longitud de la segunda hebra para reducir la expresión de genes objetivo cuando el agente de iARN se introduce en una célula de mamífero, y en donde escisión cortadora del agente de iARN preferentemente resulta in un ARNip que comprende el extremo 3' de la segunda hebra, reduciendo así la expresión del gen objetivo en el mamífero. Opcionalmente, el agente de iARN comprende además un ligando.

En un caso, la hebra sentido del agente de iARN contiene al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos se encuentra en el sitio de escisión en la hebra sentido.

En un caso, la hebra antisentido del agente de iARN también puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos se encuentra en o cerca del sitio de escisión en la hebra antisentido.

Para el agente de iARN que tiene una región de dúplex de 17-23 nt de longitud, el sitio de escisión de la hebra antisentido es típicamente alrededor de 10, 11 y 12 posiciones del extremo 5'. Por lo tanto, los motivos de tres modificaciones idénticas pueden encontrarse en las posiciones 9, 10, 11; posiciones 10, 11, 12; posiciones 11, 12, 13; posiciones 12, 13, 14; o posiciones 13, 14, 15 de la hebra antisentido, comenzando el recuento desde el 1^{er} nucleótido del extremo 5' de la hebra antisentido o comenzando el recuento desde el 1^{er} nucleótido apareado dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido. El sitio de escisión en la hebra antisentido también puede cambiar de acuerdo con la longitud de la región de dúplex de la iARN del extremo 5'.

La hebra sentido del agente de iARN puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la hebra; y la hebra antisentido puede tener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de la hebra. Cuando la hebra sentido y la hebra antisentido forman un dúplex de ARNd, la hebra sentido y la hebra antisentido pueden alinearse de modo que un motivo de los tres nucleótidos en la hebra sentido y un motivo de los tres nucleótidos en la hebra antisentido tienen al menos una superposición de nucleótidos, es decir, al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra sentido forma un par de bases con al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra antisentido. Alternativamente, al menos dos nucleótidos pueden superponerse, o los tres nucleótidos pueden superponerse.

En un caso, la hebra sentido del agente de iARN puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo debe encontrarse en o cerca del sitio de escisión de la hebra y los otros motivos pueden ser modificaciones de alas. La expresión "modificación de ala" en la presente se refiere a un motivo que ocurre en otra porción de la hebra que está separada del motivo en o cerca del sitio de escisión de la misma hebra. La modificación de ala es adyacente al primer motivo o está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos son inmediatamente adyacentes entre sí la química de los motivos son distintas entre sí y cuando los motivos se separan por uno o más nucleótidos que las químicas pueden ser los mismos o diferentes. Dos o más modificaciones de alas pueden estar presentes. Por ejemplo, cuando dos modificaciones de alas están presentes, cada modificación de alas puede encontrarse en un extremo con respecto al primer motivo que está en o cerca del sitio de escisión o en cualquier lado del motivo principal.

Al igual que la hebra sentido, la hebra antisentido del agente de iARN puede contener al menos dos motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, encontrándose al menos uno de los motivos en o cerca del sitio de escisión de la hebra. Esta hebra antisentido también puede contener una o más modificaciones de alas en una alineación similar a las modificaciones de alas que están presentes en la hebra sentido.

En un caso, la modificación de ala en la hebra sentido o hebra antisentido del agente de iARN típicamente no incluye el primero o dos primeros nucleótidos terminales en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la hebra.

En otro caso, la modificación de ala en la hebra sentido o hebra antisentido del agente de iARN típicamente no incluye el primero o dos nucleótidos apareados dentro de la región de dúplex en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la hebra.

Cuando la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de iARN contienen cada una al menos una modificación de ala, las modificaciones de alas pueden encontrarse en el mismo extremo de la región de dúplex y tener una superposición de uno, dos o tres nucleótidos.

5 Cuando la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de iARN contienen cada una al menos dos modificaciones de alas, la hebra sentido y la hebra antisentido pueden alinearse de modo que dos modificaciones cada una de una hebra se encuentran en un extremo de la región de dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una hebra se encuentran en el otro extremo de la región de dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones de una hebra se encuentran en cada lado del motivo principal, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos en la región de dúplex.

10 En un caso, puede modificarse cada nucleótido en la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de iARN, incluyendo los nucleótidos que son parte de los motivos. Cada nucleótido puede modificarse con la misma o diferente modificación, que puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos oxígenos de fosfato no de unión y/o uno o más de los oxígenos de fosfato que no son de unión; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2' hidroxilo en el azúcar ribosa; reemplazo general del resto de fosfato con enlazantes "defosfo";
15 modificación o reemplazo de una base natural; y reemplazo o modificación de la estructura principal de ribosa-fosfato.

Dado que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones ocurren en una posición que está repetida dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o un resto de fosfato, o un O no enlazante de un resto de fosfato. En algunos casos la modificación ocurrirá en todas las
20 posiciones del sujeto en el ácido nucleico pero en muchos casos no. A modo de ejemplo, una modificación puede ocurrir solamente en la posición terminal 3' o 5' en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una hebra. Una modificación puede ocurrir en una región de doble hebra, una región de una sola hebra o en ambas. Una modificación puede ocurrir solamente en la región de doble hebra de un ARN o puede ocurrir en una región de una sola hebra de un ARN. Por ejemplo, una
25 modificación de fosforotioato en una posición O no enlazante puede ocurrir solamente en uno o ambos extremos terminales, puede ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una hebra, o puede ocurrir en las regiones de doble hebra y de una sola hebra, particularmente en los extremos terminales. El extremo o extremos 5' pueden estar fosforilados.

Puede que sea posible, por ejemplo, mejorar la estabilidad, para incluir bases particulares en salientes, o para incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos en salientes de una sola hebra, por ejemplo, en una saliente 5' o
30 3', o en ambas. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en salientes. En algunos casos todas o algunas de las bases en una saliente 3' o 5' pueden modificarse, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente. Modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que son conocidas en la técnica, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-
35 fluoro (2'-F) o 2'-O-metilo modificados en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones de fosforotioato. Las salientes no necesitan ser homólogas con la secuencia objetivo.

En un caso, cada residuo de la hebra sentido y la hebra antisentido se modifica independientemente con ANB, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Las hebras pueden contener
40 más de una modificación. En un caso, cada residuo de la hebra sentido y la hebra antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro.

Al menos dos modificaciones diferentes se presentan típicamente en la hebra sentido y la hebra antisentido. Dichas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, u otras.

En un caso, el N_a y/o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternado. La expresión "motivo alternado", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, ocurriendo cada
45 modificación en nucleótidos alternados de una hebra. El nucleótido alternado puede referirse a uno por cada otro nucleótido o uno por cada tres nucleótidos o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada una un tipo de modificación del nucleótido, el motivo alternado puede ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAABAABAAB...", "AAABBBAAABBB..." o "ABCABCABCABC...", etc.

Los tipos de modificaciones contenidas en el motivo alternado pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada una un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternado, es decir, las modificaciones
50 en cada otro nucleótido, puede ser igual, pero cada una de la hebra sentido o hebra antisentido puede seleccionarse de varias posibilidades de modificaciones dentro del motivo alternado, tal como "ABABAB...", "ACACAC..." "BDBDBD..." o "CDCDCD...", etc.

En un caso, el agente de iARN de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternado en la hebra sentido con respecto al patrón de modificación para el motivo alternado en la hebra antisentido se cambia. El
55 cambio puede ser de forma tal que el grupo modificado de nucleótidos de la hebra sentido corresponde a un grupo modificado de modo diferente de nucleótidos de la hebra antisentido y viceversa. Por ejemplo, la hebra sentido cuando se aparea con la hebra antisentido en el ARNdh dúplex, el motivo alternado en la hebra sentido puede

comenzar con "ABABAB" de 5'-3' de la hebra y el motivo alternado en la hebra antisentido puede comenzar con "BABABA" de 5'-3' de la hebra dentro de la región de dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternado en la hebra sentido puede comenzar con "AABBAABB" de 5'-3' de la hebra y el motivo alternado en la hebra antisentido puede comenzar con "BBAABBAA" de 5'-3' de la hebra dentro de la región de dúplex, de modo que existe un cambio completo o parcial de los patrones de modificación entre la hebra sentido y la hebra antisentido.

En un caso, el agente de iARN comprende el patrón del motivo alternado de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la hebra sentido inicialmente tiene un cambio con respecto al patrón del motivo alternado de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la hebra antisentido inicialmente, es decir, el nucleótido 2'-O-metilo modificado en los pares de bases de hebra sentido con un nucleótido 2'-F modificado en la hebra antisentido y viceversa. La posición 1 de la hebra sentido puede comenzar con la modificación 2'-F, y la posición 1 de la hebra antisentido puede comenzar con la modificación 2'-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la hebra sentido y/o hebra antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la hebra sentido y/o hebra antisentido. La interrupción del patrón de modificación de la hebra sentido y/o antisentido mediante la introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la hebra sentido y/o antisentido mejora sorprendentemente la actividad silenciadora de genes al gen objetivo.

En un caso, cuando el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos se introduce en cualquiera de las hebras, la modificación del nucleótido junto al motivo es una modificación diferente de la modificación del motivo. Por ejemplo, la porción de la secuencia que contiene el motivo es "...N_aYYYN_b...", donde "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "N_a" y "N_b" representan una modificación al nucleótido junto al motivo "YYY" que es diferente a la modificación de Y, y donde N_a y N_b pueden ser las mismas o diferentes modificaciones. Alternativamente, N_a y/o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando hay una modificación de la presente.

El agente de iARN puede comprender además al menos una conexión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato. La modificación de la conexión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato puede ocurrir en cualquier nucleótido de la hebra sentido o hebra antisentido o ambas en cualquier posición de la hebra. Por ejemplo, la modificación de la conexión internucleotídica puede ocurrir en todos los nucleótidos en la hebra sentido o hebra antisentido; cada modificación de la conexión internucleotídica puede ocurrir en un patrón alternado en la hebra sentido o hebra antisentido; o la hebra sentido o hebra antisentido pueden contener las modificaciones de la conexión internucleotídica en un patrón alternado. El patrón alternado de la modificación de la conexión internucleotídica en la hebra sentido puede ser la misma o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternado de la modificación de la conexión internucleotídica en la hebra sentido puede tener un cambio con respecto al patrón alternado de la modificación de la conexión internucleotídica en la hebra antisentido.

En un caso, la iARN comprende la modificación de la conexión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato en la región de saliente. Por ejemplo, la región saliente puede contener dos nucleótidos que tienen una conexión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. Las modificaciones de la conexión internucleotídica también pueden realizarse para unir los nucleótidos salientes con los nucleótidos apareados terminales dentro de la región de dúplex. Por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o todos los nucleótidos salientes pueden unirse a través de una conexión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato y opcionalmente, puede haber conexiones internucleotídicas de fosforotioato o metilfosfonato adicionales que unen el nucleótido saliente con un nucleótido apareado que está junto al nucleótido saliente. Por ejemplo, puede haber al menos dos conexiones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los cuales dos de los tres nucleótidos son nucleótidos salientes y el tercero es un nucleótido apareado junto al nucleótido saliente. Preferiblemente, estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la hebra antisentido.

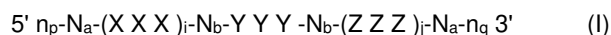
En un caso, el agente de iARN comprende uno o más apareamientos incorrectos con el objetivo, dentro del dúplex, o combinaciones de los mismos. El apareamiento incorrecto puede ocurrir en la región saliente o la región de dúplex. El par de bases puede puntuarse en base a su propensión para promover la disociación o fusión (por ejemplo, en la energía libre de asociación o disociación de un apareamiento particular, el abordaje más simple es para examinar los pares en un par de bases individual, aunque también puede utilizarse el vecino siguiente o un análisis similar). En términos de promover la disociación: Se prefiere A:U a G:C; se prefiere G:U a G:C; y se prefiere I:C a G:C (I=inosina). Los apareamientos incorrectos, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros que no son canónicos (como se describe en otra parte de la presente) se prefieren a apareamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren los apareamientos que incluyen una base universal a apareamientos canónicos.

En un caso, el agente de iARN comprende al menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases dentro de las regiones de dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido pueden seleccionarse independientemente del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares no coincidentes, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros que no son canónicos o apareamientos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la hebra antisentido en el extremo 5' del dúplex.

En un caso, el nucleótido en la posición 1 dentro de la región de dúplex del extremo 5' en la hebra antisentido se selecciona del grupo que consiste en A, dA, dU, U y dT. Alternativamente, al menos uno de los primeros 1, 2 o 3 pares de bases dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU.

5

En un caso, la secuencia de la hebra sentido puede representarse mediante la fórmula (I):



en donde:

i y j son cada uno independientemente 0 o 1;

10 p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de diferente forma;

cada N_b independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

15 cada n_p y n_q independientemente representan un nucleótido saliente;

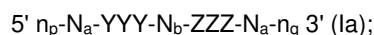
en donde N_b e Y no tienen la misma modificación; y

cada XXX, YYY y ZZZ independientemente representa un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. Preferiblemente YYY es todo de nucleótidos 2'-F modificados.

En un caso, el N_a y/o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternado.

20 En un caso, el motivo YYY se encuentra en o cerca del sitio de escisión de la hebra sentido. Por ejemplo, cuando el agente de iARN tiene una región de dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede estar en o cerca del sitio de escisión (por ejemplo, puede estar en las posiciones 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 u 11, 12, 13) de la hebra sentido, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido a partir del extremo 5'; u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, a partir del extremo 5'.

25 En un caso, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o tanto i como j son 1. La hebra sentido puede, por lo tanto, estar representada mediante las siguientes fórmulas:



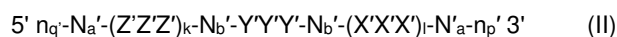
30 Cuando la hebra sentido se representa mediante la fórmula (Ia), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a independientemente puede representar una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

35 Cuando la hebra sentido se representa como la fórmula (Ib), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a independientemente puede representar una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra sentido se representa como la fórmula (Ic), cada N_b independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Cada N_a independientemente puede representar una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

40 Cada uno de X, Y y Z pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En un caso, la hebra antisentido secuencia de la iARN puede representarse mediante la fórmula (II):



en donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

45 p' y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de diferente forma;

cada N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

5 cada n_p' y n_q' independientemente representan un nucleótido saliente;

en donde N_b' e Y' no tienen la misma modificación;

y

cada $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ independientemente representa un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

10 En una realización, el N_a' y/o N_b' comprenden modificaciones de un patrón alternado.

El motivo $Y'Y'Y'$ se encuentra en o cerca del sitio de escisión de la hebra antisentido. Por ejemplo, cuando el agente de iARN tiene una región de dúplex de 17-23 nt de longitud, el motivo $Y'Y'Y'$ puede estar en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la hebra antisentido, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido a partir del extremo 5'; u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, a partir del extremo 5'. Preferiblemente, el motivo $Y'Y'Y'$ se encuentra en las posiciones 11, 12, 13.

15

En una realización, un motivo $Y'Y'Y'$ es todo de nucleótidos 2'-OMe modificados.

En una realización, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o tanto k como l son 1.

La hebra antisentido puede, por lo tanto, estar representada mediante las siguientes fórmulas:

20 $5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p' 3'$ (IIa);

$5' n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3'$ (IIb); o

$5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p' 3'$ (IIc).

25 Cuando la hebra antisentido se representa mediante la fórmula (IIa), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido se representa como la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

30 Cuando la hebra antisentido se representa como la fórmula (IIc), cada N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Cada uno de X' , Y' y Z' pueden ser iguales o diferentes entre sí.

35 Cada nucleótido de la hebra sentido y la hebra antisentido puede modificarse independientemente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, 2'-hidroxilo, 2'-desoxi o 2'-fluoro. Por ejemplo, cada nucleótido de la hebra sentido y la hebra antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Cada X , Y , Z , X' , Y' y Z' , en particular, puede representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-fluoro.

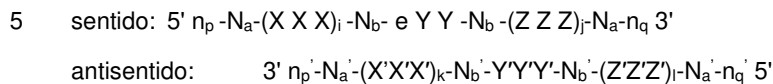
40 Según la invención, la hebra sentido del agente de iARN contiene un motivo YYY en las posiciones 9, 10 y 11 de la hebra cuando la región de dúplex es de 21 nt, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido a partir del extremo 5', u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, a partir del extremo 5'; e Y representa una modificación 2'-F. La hebra sentido adicionalmente puede contener un motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región de dúplex; y cada XXX y ZZZ independientemente representa una modificación 2'-OMe o modificación 2'-F.

45 En una realización la hebra antisentido puede contener un motivo $Y'Y'Y'$ en las posiciones 11, 12, 13 de la hebra, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido a partir del extremo 5', u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, a partir del extremo 5'; e Y' representa una modificación 2'-O-metilo. La hebra antisentido adicionalmente puede contener un motivo $X'X'X'$ o motivos $Z'Z'Z'$ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región de dúplex; y cada $X'X'X'$ y $Z'Z'Z'$ independientemente representa una modificación 2'-OMe o modificación 2'-F.

50

La hebra sentido representada mediante cualquiera de las fórmulas precedentes (Ia), (Ib) y (Ic) forma un dúplex con una hebra antisentido representada mediante cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb) y (IIc), respectivamente.

De esta forma, los agentes de iARN pueden comprender una hebra sentido y una hebra antisentido, teniendo cada hebra 14 a 30 nucleótidos, estando el dúplex de iARN representado por la fórmula (III):



(III)

en donde:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

10 p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a y N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de diferente forma;

cada N_b y N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

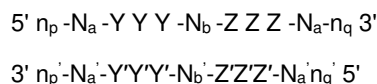
15 en donde

cada n_p' , n_p , n_q' y n_q independientemente representa un nucleótido saliente; y

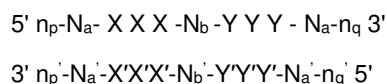
cada XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' independientemente representa un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

20 En un caso, i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 1. En otro caso, k es 1 y l es 0; k es 0 y l es 1; o tanto k como l son 1.

Combinaciones ejemplares de la hebra sentido y la hebra antisentido que forman un dúplex de iARN incluyen las siguientes fórmulas:



25 (IIIa)



(IIIb)



30 $3' n_p - N_a - X'X'X' - N_b - Y'Y'Y' - N_b - Z'Z'Z' - N_a - n_q 5'$

(IIIc)

35 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIa), cada N_b independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4 nucleótidos modificados. Cada N_a independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIb), cada N_b , N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

40 Cuando el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIc), cada N_b , N_b' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a , N_a' independientemente representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' , N_b y N_b' independientemente comprende modificaciones de un patrón alternado.

Cada X, Y y Z en la fórmulas (III), (IIIa), (IIIb) y (IIIc) pueden ser iguales o diferentes entre sí.

5 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb) o (IIIc), al menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y'. De forma alternativa, al menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y'; o los tres nucleótidos Y todos forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y'.

10 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIa) o (IIIc), al menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. De forma alternativa, al menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z'; o los tres nucleótidos Z forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z'.

15 Cuando el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIb) o (IIIc), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. De forma alternativa, al menos dos de los nucleótidos X forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos X'; o los tres nucleótidos X todos forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos X'.

20 En un caso, la modificación en el nucleótido Y es diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente de la modificación en el nucleótido Z' y/o la modificación en el nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

25 En un caso, el agente de iARN es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb) o (IIIc), en donde los dúplex están conectados mediante un enlazante. El enlazante puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero adicionalmente comprende un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios objetivo diferentes.

30 En un caso, el agente de iARN es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb) o (IIIc), en donde los dúplex están conectados mediante un enlazante. El enlazante puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero adicionalmente comprende un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios objetivo diferentes.

35 En un caso, dos agentes de iARN representados mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb) o (IIIc) están enlazados entre sí en el extremo 5', y uno o ambos de los extremos 3' se conjugan opcionalmente con un ligando. Cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen en dos sitios objetivo diferentes.

40 Varias publicaciones describen agentes de iARN multiméricos. Dichas publicaciones incluyen los documentos WO2007/091269, Patente de los Estados Unidos No. 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520.

45 El agente de iARN que contiene conjugaciones de uno o más restos de carbohidratos con un agente de iARN puede optimizar una o más propiedades del agente de iARN. En muchos casos, el resto de carbohidrato estará unido a una subunidad modificada del agente de iARN. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótidos de un agente de ARNdH puede reemplazarse por otro resto, por ejemplo, un portador no carbohidrato (preferiblemente cíclico) al cual se une un ligando de carbohidrato. Una subunidad de ribonucleótidos en la cual el azúcar ribosa de la subunidad se ha reemplazado de este modo se denomina en la presente como una subunidad de modificación de reemplazo de ribosa (SMRR). Un portador cíclico puede ser un sistema de anillos carbocíclico, es decir, todos los átomos del anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillos heterocíclico, es decir, uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre. El portador cíclico puede ser un sistema de anillos monocíclico, o puede contener dos o más anillos, por ejemplo, anillos fusionados. El portador cíclico puede ser un sistema de anillos completamente saturados, o puede contener uno o más enlaces dobles.

50 El ligando puede estar unido al polinucleótido a través de un portador. Los portadores incluyen (i) al menos un "punto de unión de estructura principal", preferiblemente dos "puntos de unión de estructura principal" y (ii) al menos un "punto de unión de conexión". Un "punto de unión a estructura principal" tal como se utiliza en la presente se refiere a un grupo funcional, por ejemplo, un grupo hidroxilo o, generalmente, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del portador en la estructura principal, por ejemplo, el fosfato, o fosfato modificado, por ejemplo, azufre que contiene, estructura principal, de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión de conexión" (TAP) en algunas realizaciones se refiere a un átomo de anillo constituyente del portador cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que proporciona un punto de unión de estructura principal) que conecta un resto seleccionado. El resto puede ser, por ejemplo, un carbohidrato, por ejemplo, monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido. Opcionalmente, el resto seleccionado se conecta mediante una conexión interviniente al portador cíclico. Por lo tanto, el portador cíclico a menudo incluirá un grupo funcional, por ejemplo, un grupo amino, o generalmente proporcionará un enlace que es adecuado para la incorporación o conexión de otra entidad química, por ejemplo, un ligando al anillo constituyente.

Los agentes de iARN pueden conjugarse con un ligando mediante un portador, en donde el portador puede ser un grupo cíclico o acíclico; preferiblemente, el grupo cíclico se selecciona de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalino; preferiblemente, el grupo acíclico se selecciona de estructura principal de serinol o estructura principal dietanolamina.

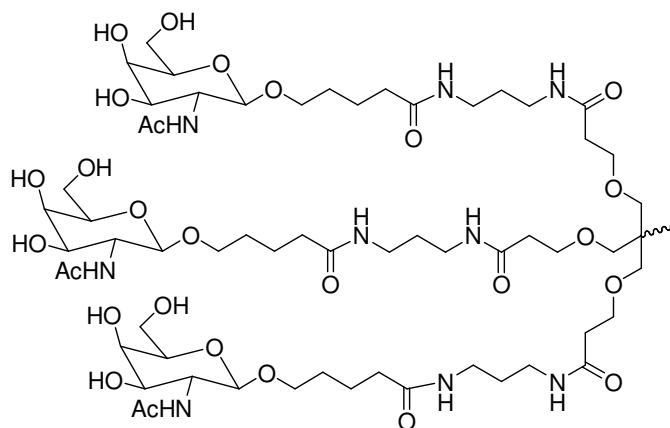
5 En algunas realizaciones específicas, el agente de iARN de la invención es un agente que se selecciona del grupo de agentes que figuran en la Tabla 1 y consiste en D1000, D1001, D1002, D1003, D1004, D1005, D1006, D1007, D1008, D1009, D1010, D1011, D1012, D1013, D1014, D1015, D1016, D1017, D1018, D1019, D1020, D1021, D1022, D1023, D1024, D1025, D1026, D1027, D1028, D1029, D1030, D1031, D1032, D1033, D1034, D1035, 10 D1036, D1037, D1038, D1039, D1040, D1041, D1042, D1043, D1044, D1045, D1046, D1047, D1048, D1049, D1050, D1051, D1052, D1053, D1054, D1055, D1056, D1057, D1058, D1059, D1060, D1061, D1062, D1063, D1064, D1065, D1066, D1067, D1068, D1069, D1070, D1071, D1072, D1073, D1074, D1075, D1076, D1077, D1078, D1079, D1080, D1081, D1082, D1083, D1084, D1085, D1086, D1087, D1088, D1089, D1090, D1091, D1092, D1093, D1094, D1095, D1096, D1097, D1098, D1099, D1100, D1101, D1102, D1103, D1104, D1105, 15 D1106, D1107, D1108, D1109, D1110, D1111, D1112, D1113, D1114, D1115, D1116, D1117, D1118, D1119, D1120, D1121, D1122, D1123, D1124, D1125, D1126, D1127, D1128, D1129, D1130, D1131, D1132, D1133, D1134, D1135, D1136, D1137, D1138, D1139, D1140, D1141, D1142, D1143, D1144, D1145, D1146, D1147, D1148, D1149, D1150, D1151, D1152, D1153, D1154, D1155, D1156, D1157, D1158, D1159, D1160, D1161, D1162, D1163, D1164, D1165, D1166, D1167, D1168, D1169, D1170, D1171, D1172, D1173, D1174, D1175, 20 D1176, D1177, D1178, D1179, D1180, D1181, D1182, D1183, D1184, D1185, D1186, D1187, D1188, D1189, D1190, D1191, D1192, D1193, D1194, D1195, D1196, D1197, D1198, D1199, D1200, D1201, D1202, D1203, D1204, D1205, D1206, D1207, D1208, D1209, D1210, D1211, D1212, D1213, D1214, D1215, D1216, D1217, D1218, D1219, D1220, D1221, D1222, D1223, D1224, D1225, D1226, D1227, D1228, D1229, D1230, D1231, D1232, D1233, D1234, D1235, D1236, D1237, D1238, D1239, D1240, D1241, D1242, D1243, D1244, D1245, 25 D1246, D1247, D1248, D1249, D1250, D1251, D1252, D1253, D1254, D1255, D1256, D1257, D1258, D1259, D1260, D1261, D1262, D1263, D1264, D1265, D1266, D1267, D1268, D1269, D1270, D1271, D1272, D1273, D1274, D1275, D1276, D1277, D1278, D1279, D1280, D1281, D1282, D1283, D1284, D1285, D1286, D1287, D1288, D1289, D1290, D1291, D1292, D1293, D1294, D1295, D1296, D1297, D1298, D1299, D1300, D1301, D1302, D1303, D1304, D1305, D1306, D1307, D1308, D1309, D1310, D1311, D1312, D1313, D1314, D1315, 30 D1316, D1317, D1318, D1319, D1320, D1321, D1322, D1323, D1324, D1325, D1326, D1327, D1328, D1329, D1330, D1331, D1332, D1333, D1334, D1335, D1336, D1337, D1338, D1339, D1340, D1341, D1342, D1343, D1344, D1345, D1346, D1347, D1348, D1349, D1350, D1351, D1352, D1353, D1354, D1355, D1356, D1357, D1358, D1359, D1360, D1361, D1362, D1363, D1364, D1365, D1366, D1367, D1368, D1369, D1370, D1371, D1372, D1373, D1374, D1375, D1376, D1377, D1378, D1379, D1380, D1381, D1382, D1383, D1384, D1385, 35 D1386, D1387, D1388, D1389, D1390, D1391, D1392, D1393, D1394, D1395, D1396, D1397, D1398, D1399, D1400, D1401, D1402, D1403, D1404, D1405, D1406, D1407, D1408, D1409, D1410, D1411, D1412, D1413, D1414, D1415, D1416, D1417, D1418, D1419, D1420, D1421, D1422, D1423, D1424, D1425, D1426, D1427, D1428, D1429, D1430, D1431, D1432, D1433, D1434, D1435, D1436, D1437, D1438, D1439, D1440, D1441, D1442, D1443, D1444, D1445, D1446, D1447, D1448, D1449, D1450, D1451, D1452, D1453, D1454, D1455, 40 D1456, D1457, D1458, D1459, D1460, D1461, D1462, D1463, D1464, D1465, D1466, D1467, D1468, D1469, D1470, D1471, D1472, D1473, D1474, D1475, D1476, D1477, D1478, D1479, D1480, D1481, D1482, D1483, D1484, D1485, D1486, D1487, D1488, D1489, D1490, D1491, D1492, D1493, D1494, D1495, D1496, D1497, D1498, D1499, D1500, D1501, D1502, D1503, D1504, D1505, D1506, D1507, D1508, D1509, D1510, D1511, D1512, D1513, D1514, D1515, D1516, D1517, D1518, D1519, D1520, D1521, D1522, D1523, D1524, D1525, 45 D1526, D1527, D1528, D1529, D1530, D1531, D1532, D1533, D1534, D1535, D1536, D1537, D1538, D1539, D1540, D1541, D1542, D1543, D1544, D1545, D1546, D1547, D1548, D1549, D1550, D1551, D1552, D1553, D1554, D1555, D1556, D1557, D1558, D1559, D1560, D1561, D1562, D1563, D1564, D1565, D1566, D1567, D1568, D1569, D1570, D1571, D1572, D1573, D1574, D1575, D1576, D1577, D1578, D1579, D1580, D1581, D1582, D1583, D1584, D1585, D1586, D1587, D1588, D1589, D1590, D1591, D1592, D1593, D1594, D1595, 50 D1596, D1597, D1598, D1599, D1600, D1601, D1602, D1603, D1604, D1605, D1606, D1607, D1608, D1609, D1610, D1611, D1612, D1613, D1614, D1615, D1616, D1617, D1618, D1619, D1620, D1621, D1622, D1623, D1624, D1625, D1626, D1627, D1628, D1629, D1630, D1631, D1632, D1633, D1634, D1635, D1636, D1637, D1638, D1639, D1640, D1641, D1642, D1643, D1644, D1645, D1646, D1647, D1648, D1649, D1650, D1651, D1652, D1653, D1654, D1655, D1656, D1657, D1658, D1659, D1660, D1661, D1662, D1663, D1664, D1665, 55 D1666, D1667, D1668, D1669, D1670, D1671, D1672, D1673, D1674, D1675, D1676, D1677, D1678, D1679, D1680, D1681, D1682, D1683, D1684, D1685, D1686, D1687, D1688, D1689, D1690, D1691, D1692, D1693, D1694, D1695, D1696, D1697, D1698, D1699, D1700, D1701, D1702, D1703, D1704, D1705, D1706, D1707, D1708, D1709, D1710, D1711, D1712, D1713, D1714, D1715, D1716, D1717, D1718, D1719, D1720, D1721, D1722, D1723, D1724, D1725, D1726, D1727, D1728, D1729, D1730, D1731, D1732, D1733, D1734, D1735, 60 D1736, D1737, D1738, D1739, D1740, D1741, D1742, D1743, D1744, D1745, D1746, D1747, D1748, D1749, D1750, D1751, D1752, D1753, D1754, D1755, D1756, D1757, D1758, D1759, D1760, D1761, D1762, D1763, D1764, D1765, D1766, D1767, D1768, D1769, D1770, D1771, D1772, D1773, D1774, D1775, D1776, D1777, D1778, D1779, D1780, D1781, D1782, D1783, D1784, D1785, D1786, D1787, D1788, D1789, D1790, D1791, D1792, D1793, D1794, D1795, D1796, D1797, D1798, D1799, D1800, D1801, D1802, D1803, D1804, D1805, 65 D1806, D1807, D1808, D1809, D1810, D1811, D1812, D1813, D1814, D1815, D1816, D1817, D1818, D1819,

5 D1820, D1821, D1822, D1823, D1824, D1825, D1826, D1827, D1828, D1829, D1830, D1831, D1832, D1833,
 D1834, D1835, D1836, D1837, D1838, D1839, D1840, D1841, D1842, D1843, D1844, D1845, D1846, D1847,
 D1848, D1849, D1850, D1851, D1852, D1853, D1854, D1855, D1856, D1857, D1858, D1859, D1860, D1861,
 D1862, D1863, D1864, D1865, D1866, D1867, D1868, D1869, D1870, D1871, D1872, D1873, D1874, D1875,
 10 D1876, D1877, D1878, D1879, D1880, D1881, D1882, D1883, D1884, D1885, D1886, D1887, D1888, D1889,
 D1890, D1891, D1892, D1893, D1894, D1895, D1896, D1897, D1898, D1899, D1900, D1901, D1902, D1903,
 D1904, D1905, D1906, D1907, D1908, D1909, D1910, D1911, D1912, D1913, D1914, D1915, D1916, D1917,
 D1918, D1919, D1920, D1921, D1922, D1923, D1924, D1925, D1926, D1927, D1928, D1929, D1930, D1931,
 D1932, D1933, D1934, D1935, D1936, D1937, D1938, D1939, D1940, D1941, D1942, D1943, D1944, D1945,
 15 D1946, D1947, D1948, D1949, D1950, D1951, D1952, D1953, D1954, D1955, D1956, D1957, D1958, D1959,
 D1960, D1961, D1962, D1963, D1964, D1965, D1966, D1967, D1968, D1969, D1970, D1971, D1972, D1973,
 D1974, D1975, D1976, D1977, D1978, D1979, D1980, D1981, D1982, D1983, D1984, D1985, D1986, D1987,
 D1988, D1989, D1990, D1991, D1992, D1993, D1994, D1995, D1996, D1997, D1998, D1999, D2000, D2001,
 D2002, D2003, D2004, D2005, D2006, D2007, D2008, D2009, D2010, D2011, D2012, D2013, D2014, D2015,
 20 D2016, D2017, D2018, D2019, D2020, D2021, D2022, D2023, D2024, D2025, D2026, D2027, D2028, D2029,
 D2030, D2031, D2032, D2033, D2034, D2035, D2036, D2037, D2038, D2039, D2040, D2041, D2042, D2043,
 D2044, D2045, D2046, D2047, D2048, D2049, D2050, D2051, D2052, D2053, D2054, D2055, D2056, D2057,
 D2058, D2059, D2060, D2061, D2062, D2063, D2064, D2065, D2066, D2067, D2068, D2069, D2070, D2071,
 D2072, D2073, D2074, D2075, D2076, D2077, D2078, D2079, D2080, D2081, D2082, D2083, D2084, D2085,
 D2086, D2087, D2088, D2089, D2090 y D2091.

Estos agentes pueden comprender, además, un ligando, tal como un ligando GalNAc.

Ligandos

25 Los agentes de iARN de la divulgación, por ejemplo, agentes de iARN de doble hebra, pueden estar conjugados
 opcionalmente a uno o más ligandos. El ligando puede estar unido a la hebra sentido, hebra antisentido o ambas
 hebras, en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos. Por ejemplo, el ligando puede estar conjugado con la hebra
 sentido. En realizaciones preferidas, el ligando se conjuga al extremo 3' de la hebra sentido. En los agentes de iARN
 de la invención, el ligando es un ligando GalNAc. En realizaciones particularmente preferidas, el ligando es GalNAc₃:



30 Una amplia variedad de entidades pueden acoplarse a los agentes de iARN de la presente invención. Restos
 preferidos son ligandos, que están acoplados, preferiblemente covalentemente, ya sea directamente o
 indirectamente a través de una conexión interviniente.

35 Un ligando puede alterar la distribución, objetivo o vida de la molécula a la cual está incorporada. En casos
 preferidos un ligando proporciona una afinidad mejorada para un objetivo seleccionado, por ejemplo, molécula,
 célula o tipo de célula, compartimento, receptor, por ejemplo, un compartimento celular o de órgano, tejido, órgano
 o región del cuerpo, como, por ejemplo, en comparación con una especie ausente tal como un ligando. Los ligandos
 que proporcionan afinidad mejorada para un objetivo seleccionado también se denominan ligandos dirigidos.

40 Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del
 endosoma y/o transporte de la composición de la invención, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la
 célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra una actividad de
 membrana dependiente de pH y fusogenicidad. En una realización, el ligando endosomolítico asume su
 conformación activa en el pH endosomal. La conformación "activa" es la conformación en la cual el ligando
 endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus

componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. Ligandos endosomolíticos ejemplares incluyen el péptido GALA (Subbarao *et al.*, *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) y sus derivados (Turk *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). En una realización, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que se someterá a un cambio en la carga o protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado.

Los ligandos pueden mejorar el transporte, hibridación y propiedades de especificidad y pueden mejorar también la resistencia de nucleasa del oligorribonucleótido modificado o natural resultante o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descrita en la presente y/o ribonucleótidos modificados o naturales.

Los ligandos en general pueden incluir modificantes terapéuticos, por ejemplo, para mejorar la captación; compuestos diagnósticos o grupos reporteros por ejemplo, para monitorear la distribución; agentes de reticulación y restos que confieren resistencia a la nucleasa. Ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas e imitaciones de péptidos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un ácido de poliamina sintético, un oligonucleótido (por ejemplo, un aptámero). Ejemplos de ácidos de poliamina incluyen ácido de poliamina es una polilisina (PLL), poli L-ácido aspártico, poli L-ácido glutámico, copolímero de anhídrido de estireno-ácido maleico, copolímero poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero de anhídrido de éter maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(2-ácido etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplo de poliaminas incluye: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina de dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido helicoidal alfa.

Los ligandos también pueden incluir grupos dirigidos, por ejemplo, un agente que se dirige a células o tejido, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico tal como una célula de riñón. Un grupo dirigido puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente de N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, una imitación de un péptido RGD o un aptámero.

Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticuladores (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sapphirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales o un quelante (por ejemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, 1-ácido butírico de pireno, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanediol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolcólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados peptídicos (por ejemplo, péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radioetiquetados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupamientos de imidazol, conjugados acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica para un co-ligando, o anticuerpos por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específica tal como una célula cancerosa, célula endotelial o célula ósea. Los ligandos también incluyen hormonas y receptoras de hormonas. Ellos también pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente de N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de quinasa p38 MAP o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco, que puede aumentar la captación del agente de iARN en la célula, por ejemplo, mediante la alteración del citoesqueleto de la célula, por ejemplo, mediante la alteración de los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinólido, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

El ligando puede aumentar la captación del oligonucleótido en la célula mediante, por ejemplo, la activación de una respuesta inflamatoria. Ligandos ejemplares que tendrían dicho efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), interleuquina-1 beta o interferón gamma.

5 En un aspecto, el ligando es un lípido o molécula en base a lípidos. Dicho lípido o molécula a base de lípidos se une preferiblemente a una proteína de suero, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido objetivo, por ejemplo, un tejido objetivo no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido objetivo puede ser el hígado, incluyendo células parenquimales del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA también pueden utilizarse como ligandos. Por ejemplo, también puede utilizarse naproxeno o aspirina. Un lípido o ligando en base a lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) 10 aumentar el direccionamiento o transporte en una célula objetivo o membrana celular y/o (c) puede utilizarse para ajustar la unión a una proteína de suero, por ejemplo, HSA.

Un ligando en base a lípidos puede utilizarse para modular, por ejemplo, controlar la unión del conjugado a un tejido objetivo. Por ejemplo, será menos probable que un lípido o ligando en base a lípidos que se une a HSA más fuertemente sea dirigido al riñón y de este modo menos probable que sea eliminado del cuerpo. Un lípido o ligando 15 en base a lípidos que se une a HSA menos fuertemente puede utilizarse para dirigir el conjugado al riñón.

En un caso preferido, el ligando en base a lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de modo que el conjugado se distribuirá preferiblemente a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión HSA-ligando no pueda revertirse.

20 En otro caso preferido, el ligando en base a lípidos se une a HSA levemente o no se une en absoluto, de modo que el conjugado se distribuirá preferiblemente al riñón. Otros restos que se dirigen a las células de riñón también pueden utilizarse en lugar o además del ligando en base a lípidos.

En otro aspecto, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina, que es captado por una célula objetivo, por ejemplo, una célula proliferante. Estas son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por la proliferación de células no deseadas, por ejemplo, del tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. 25 Vitaminas ejemplares incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas ejemplares incluyen vitaminas B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por células cancerosas. También se incluyen HAS, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación de células, preferiblemente un agente de permeación de células helicoidales. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ejemplar es un péptido tal como tat o antenopodia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, conexiones no peptídicas o pseudo-peptídicas, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una fase lipófila. 30

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente como un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El péptido o resto peptidomimético puede ser de aproximadamente 5-50 aminoácido de longitud, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud. Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación de células, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (por ejemplo, que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímero, péptido restringido o péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una 35 secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS). Un péptido que contiene MTS hidrófoba ejemplar es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:4). Un análogo RFGF (por ejemplo, secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP) (SEQ ID NO:5) que contiene una MTS hidrófoba también puede ser un resto dirigido. El resto peptídico puede ser un péptido "de suministro", que puede portar moléculas polares grandes, incluyendo péptidos, oligonucleótidos y proteína en las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat VIH (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO:6) y la proteína Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO:7) son capaces de funcionar como péptidos de suministro. Un péptido o peptidomimético puede codificarse mediante una secuencia aleatoria de ADN, de modo que un péptido identificado de una biblioteca que expresa bacteriófagos o una biblioteca combinatoria una-perla-un-compuesto (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Preferiblemente el péptido o peptidomimético conectado a un agente 40 de iARN a través de una unidad de monómero incorporado es un péptido que se dirige a una célula tal como un péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o imitación de RGD. Un resto peptídico puede estar en el rango de longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos de péptido pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o dirigir propiedades conformacionales. Puede utilizarse cualquiera de las modificaciones estructurales descritas más adelante. Un resto peptídico RGD 45 puede utilizarse para dirigirse a una célula tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente de iARN a tumores de una variedad de otros tejidos, incluyendo el pulmón, riñón, bazo o hígado (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Preferiblemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de iARN al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico y se puede modificar, por ejemplo, glicosilar o metilar, para facilitar el direccionamiento a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD 50

glicosilado puede suministrar un agente de iARN a una célula tumoral que expresa $\alpha\beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001). Pueden utilizarse los péptidos que los marcadores objetivos enriquecieron en células proliferantes. Por ejemplo, el RGD que contiene péptidos y peptidomiméticos puede dirigirse a células cancerosas, en particular células que exhiben una integrina. Por lo tanto, uno puede utilizar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, así como imitaciones RGD sintéticas. Además de RGD, uno puede utilizar restos que se dirigen al ligando de integrina. Generalmente, dichos ligandos pueden utilizarse para controlar células proliferantes y angiogénesis. Conjugados preferidos de este tipo de ligando se dirigen a PECAM-1, VEGF u otro gen canceroso, por ejemplo, un gen canceroso descrito en la presente.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de permear una célula, por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido de permeación celular microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contiene un enlace de disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contiene solamente uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartita, tal como MPG, que se deriva del dominio de péptido de fusión de VIH-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

En un caso, un péptido dirigido puede ser un péptido α -helicoidal anfipático. Péptidos α -helicoidales anfipáticos ejemplares incluyen, a modo no taxativo, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos S. clava, péptidos antimicrobianos intestinales de mixinos (HFIAPs), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos Xenopus, esculentinis-1 y caerinas. Una cantidad de factores se considerarán preferiblemente para mantener la integridad de la estabilidad de la hélice. Por ejemplo, se utilizará una cantidad máxima de residuos de estabilización de hélice (por ejemplo, leu, ala o lys) y se utilizará una cantidad mínima de residuos de desestabilización de hélice (por ejemplo, prolina o unidades monoméricas cíclicas). Se considerará el residuo protector (por ejemplo Gly es un residuo protector de N ejemplar y/o puede utilizarse la amidación del extremo C para proporcionar un enlace H extra para estabilizar la hélice. La formación de puentes salinos entre los residuos con cargas opuestas, separados por las posiciones $i \pm 3$ o $i \pm 4$ pueden proporcionar estabilidad. Por ejemplo, residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homo-arginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o aspartato.

Los ligandos de péptido y peptidomimético incluyen aquellos que tienen péptidos naturales o modificados, por ejemplo, péptidos D o L; péptidos α , β o γ ; péptidos N-metilos; azapéptidos; péptidos que tienen una o más amidas, es decir, péptido, conexiones reemplazadas con uno o más urea, tiourea, carbamato o conexiones de urea sulfonilo; o péptidos cíclicos.

El ligando dirigido puede ser cualquier ligando que es capaz de dirigirse a un receptor específico. Ejemplos son los siguientes: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, agrupamientos de azúcares tales como agrupamiento de GalNAc, agrupamiento de manosa, agrupamiento de galactosa o un aptámero. Un agrupamiento es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos dirigidos también incluyen ligandos del receptor de integrina, ligandos del receptor de quimioquina, transferrina, biotina, ligandos del receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos LDL y HDL. Los ligandos también pueden basarse en ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones divulgadas en la presente.

Agentes de liberación endosomal incluyen imidazoles, poli u oligoimidazoles, PEIs, péptidos, péptidos fusogénicos, policaboxilatos, policationes, oligo o poli cationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/poliacetales, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas.

Modulador FC significa modulador farmacocinético. Moduladores de la FC incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas etc. Moduladores de la FC ejemplares incluyen, a modo no taxativo, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. También se conoce que los oligonucleótidos que comprenden una cantidad de conexiones de fosforotioato se unen a la proteína de suero, por lo tanto los oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples conexiones de fosforotioato en la estructura principal también son abordables para la presente invención como ligandos (por ejemplo, como ligandos moduladores de la FC).

Además, los aptámeros que se unen a componentes de suero (por ejemplo, proteínas de suero) también son abordables para la presente invención como ligandos moduladores de la FC.

Otros conjugados de ligandos abordables para la invención se describen en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos USSN: 10/916,185, presentada el 10 de agosto de 2004; USSN: 10/946,873, presentada el 21 de setiembre 2004; USSN: 10/833,934, presentada el 3 de agosto de 2007; USSN: 11/115,989 presentada el 27 de abril de 2005 y USSN: 11/944,227 presentada el 21 de noviembre de 2007.

Cuando dos o más ligandos están presentes, los ligandos pueden tener las mismas propiedades, todos tienen propiedades diferentes o algunos ligandos tienen las mismas propiedades mientras que otros tienen diferentes propiedades. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de direccionamiento, tener actividad endosomolítica o tener propiedades moduladoras FC. En una realización preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

5 Los ligandos pueden acoplarse a los oligonucleótidos en varios lugares, por ejemplo, extremo 3', extremo 5' y/o en una posición interna. En realizaciones preferidas, el ligando está unido a los oligonucleótidos a través de una conexión interviniente, por ejemplo, un portador descrito en la presente. El ligando o ligando conectado puede estar presente en un monómero cuando el monómero se incorpora en la hebra en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse a través del acoplamiento a un monómero "precursor" después de que el monómero
10 "precursor" se ha incorporado en la hebra de crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, por ejemplo, una conexión amino-terminada (es decir, que tiene un ligando no asociado), por ejemplo, TAP-(CH₂)_nNH₂ puede incorporarse en una hebra de oligonucleótido de crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, un ligando que tiene un grupo electrofílico, por ejemplo, un éster pentafluorofenilo o grupo aldehído, puede estar unido posteriormente al monómero precursor mediante el
15 acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico de la conexión del monómero precursor.

En otro ejemplo, puede incorporarse un monómero que tiene un grupo químico adecuado para tomar parte en la reacción de una química "clic", por ejemplo, una conexión/enlazante terminado de azida o alquino. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, un ligando que tiene un grupo químico complementario, por ejemplo, un alquino o azida puede unirse al monómero precursor mediante el
20 acoplamiento del alquino y la azida juntos.

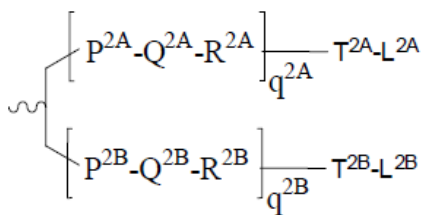
Para los oligonucleótidos de doble hebra, los ligandos pueden unirse a una o ambas hebras. En algunas realizaciones, un agente de iARN de doble hebra contiene un ligando conjugado con la hebra sentido. En otras realizaciones, un agente de iARN de doble hebra contiene un ligando conjugado con la hebra antisentido.

En algunos casos, el ligando puede conjugarse a nucleobases, restos de azúcar o conexiones internucleosídicas de moléculas de ácido nucleico. La conjugación a nucleobases de purina o derivados de las mismas pueden ocurrir en cualquier posición incluyendo, átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunos casos, las posiciones 2-, 6-, 7- u 8- de una nucleobase de purina se unen a un resto de conjugado. La conjugación a nucleobases de pirimidina o derivados de la misma también puede ocurrir en cualquier posición. En algunos casos, las posiciones 2-, 5- y 6- de una nucleobase de pirimidina pueden sustituirse con un resto de conjugado. La conjugación a restos de azúcar de nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono. Átomos de carbono ejemplares de un resto de azúcar que
25 puede unirse a un resto de conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también puede unirse a un resto de conjugado, tal como en un residuo abásico. Las conexiones internucleosídicas también pueden contener restos conjugados. Para las conexiones que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforodiotato, fosforoamidato y similares), el resto conjugado puede estar unido directamente al átomo de fósforo o a un átomo O, N o S unido al átomo de fósforo. Para las conexiones internucleosídicas que contienen amina o amida (por ejemplo, APN), el resto conjugado puede estar unido al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.
30

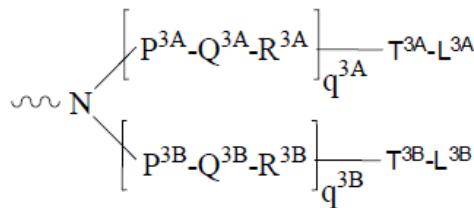
Puede utilizarse cualquier ligando adecuado en el campo de la interferencia de ARN, aunque el ligando es típicamente un carbohidrato, por ejemplo monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, polisacárido.
35

Las conexiones que conjugan el ligando al ácido nucleico incluyen aquellas descritas anteriormente. Por ejemplo, el ligando puede ser uno o más derivados de GalNAc (*N*-acetilglucosamina) unidos a través de enlazantes ramificados bivalentes o trivalentes.

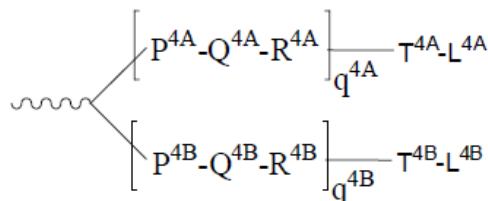
En un caso, el ARNdh está conjugado con enlazantes ramificados bivalentes y trivalentes incluyen las estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (IV) - (VII):
40



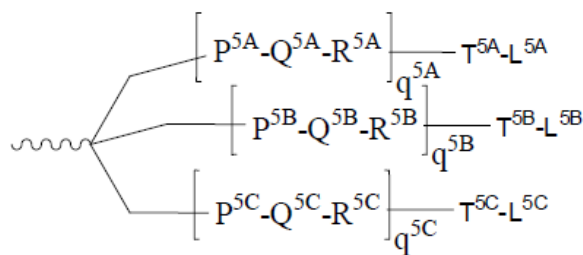
Fórmula (IV)



Fórmula (V)



Fórmula (VI)



Fórmula (VII)

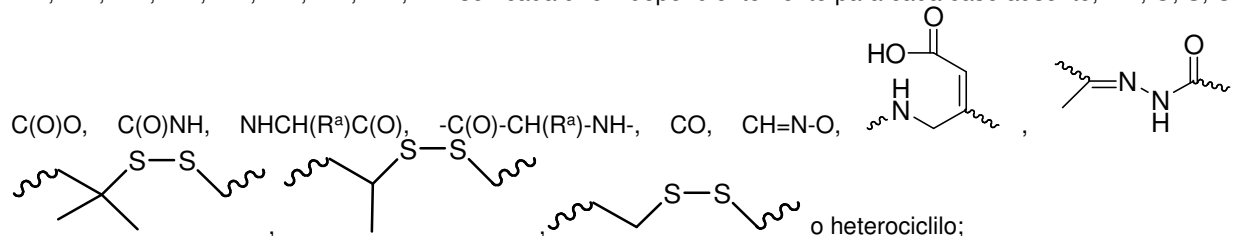
en donde:

$q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ y $q^{5\text{C}}$ representan independientemente para cada caso 0-20 y en donde la unidad de repetición puede ser la misma o diferente;

- 5 $P^{2\text{A}}$, $P^{2\text{B}}$, $P^{3\text{A}}$, $P^{3\text{B}}$, $P^{4\text{A}}$, $P^{4\text{B}}$, $P^{5\text{A}}$, $P^{5\text{B}}$, $P^{5\text{C}}$, $T^{2\text{A}}$, $T^{2\text{B}}$, $T^{3\text{A}}$, $T^{3\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{4\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{5\text{B}}$, $T^{5\text{C}}$ son cada una independientemente para cada caso ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH o CH₂O;

$Q^{2\text{A}}$, $Q^{2\text{B}}$, $Q^{3\text{A}}$, $Q^{3\text{B}}$, $Q^{4\text{A}}$, $Q^{4\text{B}}$, $Q^{5\text{A}}$, $Q^{5\text{B}}$, $Q^{5\text{C}}$ son independientemente para cada caso ausente, alquileno, alquileno sustituido en donde uno o más metilenos pueden interrumpirse o terminarse por uno o más de O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

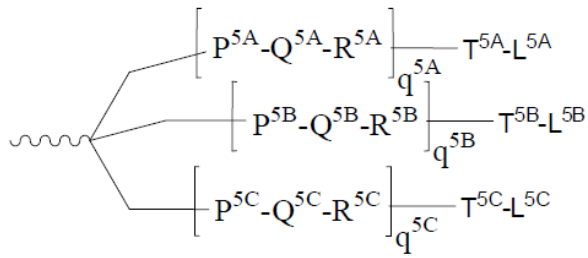
- 10 $R^{2\text{A}}$, $R^{2\text{B}}$, $R^{3\text{A}}$, $R^{3\text{B}}$, $R^{4\text{A}}$, $R^{4\text{B}}$, $R^{5\text{A}}$, $R^{5\text{B}}$, $R^{5\text{C}}$ son cada uno independientemente para cada caso ausente, NH, O, S, CH₂,



$L^{2\text{A}}$, $L^{2\text{B}}$, $L^{3\text{A}}$, $L^{3\text{B}}$, $L^{4\text{A}}$, $L^{4\text{B}}$, $L^{5\text{A}}$, $L^{5\text{B}}$ y $L^{5\text{C}}$ representan el ligando; es decir, cada uno independientemente para cada caso un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y

- 15 R^a es H o una cadena lateral de aminoácidos.

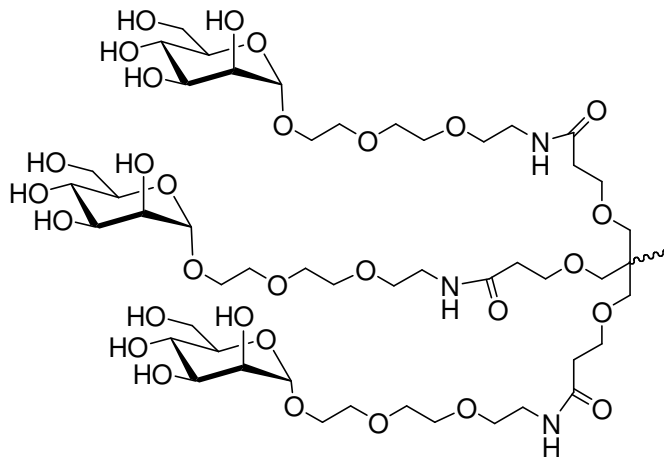
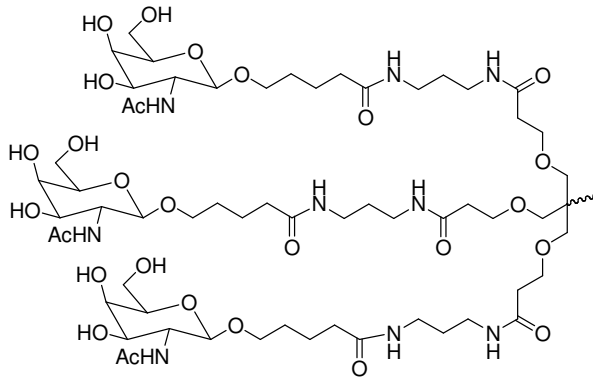
Los derivados de GalNAc de conjugación trivalentes son particularmente útiles para su uso con agentes de iARN para inhibir la expresión de un gen objetivo, tal como aquellos de la fórmula (VII):

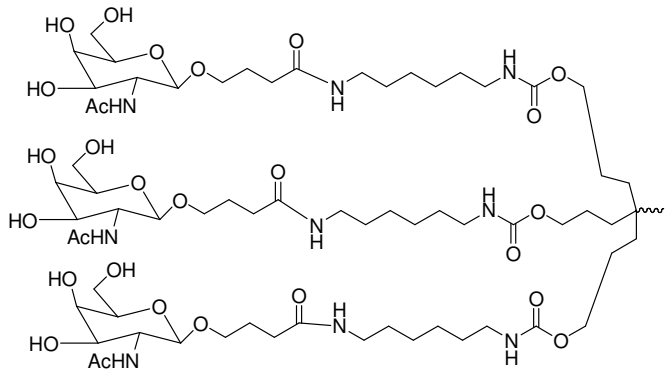
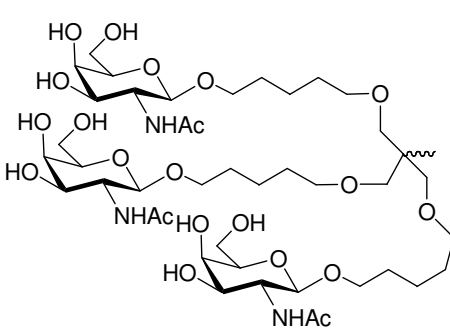
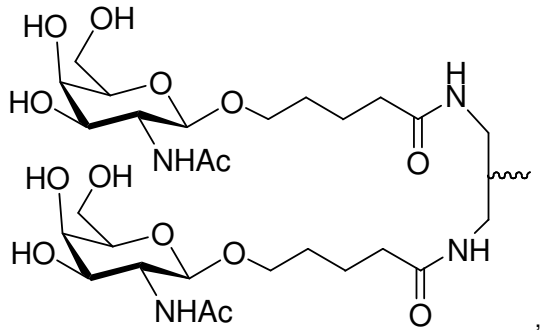
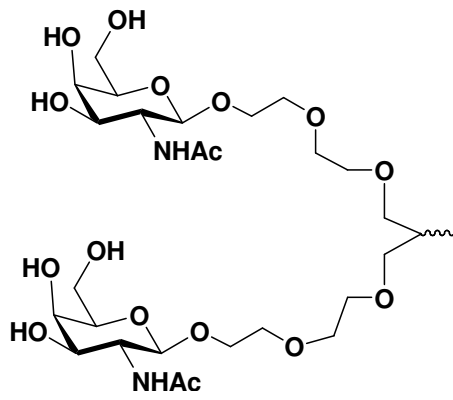
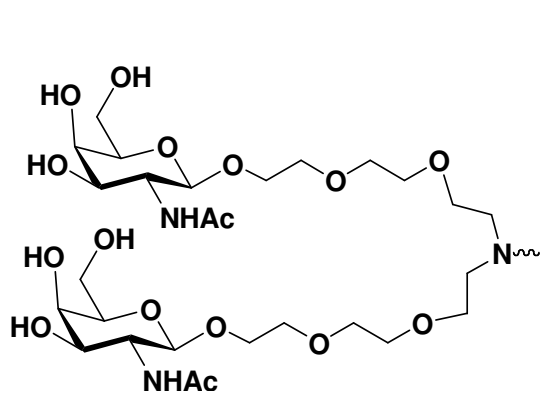
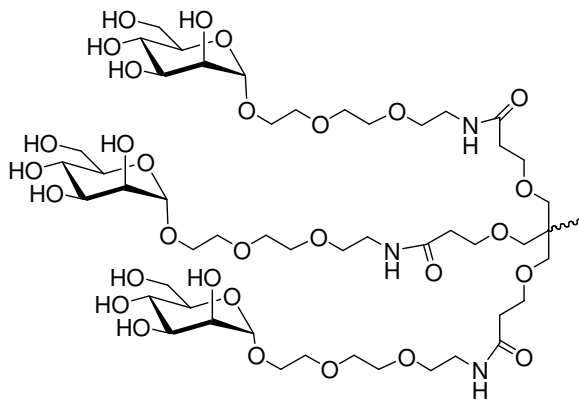


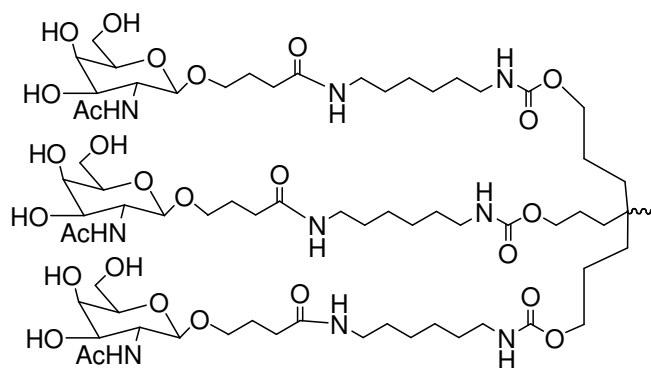
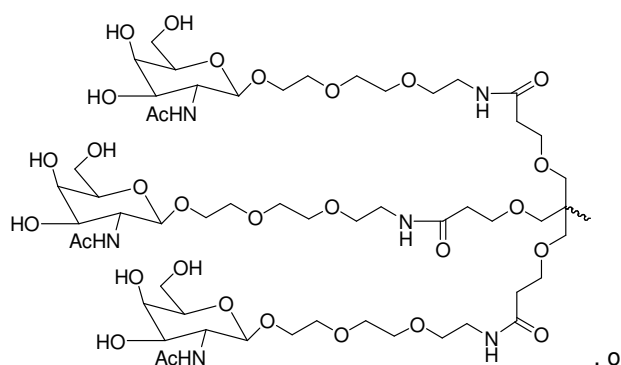
Fórmula (VII)

en donde L^{5A} , L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como un derivado de GalNAc.

Ejemplos de derivados de GalNAc que conjugan grupos enlazantes ramificados bivalentes y trivalentes adecuados incluyen, a modo no taxativo, los siguientes compuestos:







- 5 En otras realizaciones, el agente de iARN de la invención es un agente seleccionado del grupo que consiste en AD-45163, AD-45165, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547.

III. Composiciones farmacéuticas

Los agentes de iARN de la invención pueden formularse para administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicamentos para humanos o animales, por analogía con otros productos farmacéuticos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de iARN de la invención pueden ser, por ejemplo, soluciones con o sin un tampón o composiciones que contienen portadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones acuosas o cristalinas, formulaciones liposomales, formulaciones micelares, emulsiones y vectores para terapia de genes.

En los métodos, el agente de iARN puede administrarse en una solución. Un agente de iARN libre puede administrarse en una solución sin tamponar, por ejemplo, en solución salina o en agua. Alternativamente, el ARNip libre puede administrarse también en una solución tamponadora adecuada. La solución tamponadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de las mismas. En una realización preferida, la solución tamponadora es solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución tamponadora que contiene el agente de iARN pueden ajustarse de manera tal que sea adecuado para administrar a un sujeto.

En algunos casos, la solución tamponadora comprende además un agente para controlar la osmolaridad de la solución, de forma tal que la osmolaridad se mantenga en un valor deseado, por ejemplo, en los valores fisiológicos del plasma humano. Las solutos que pueden agregarse a la solución tamponadora para controlar la osmolaridad incluyen, a modo no taxativo, proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos o sales. En algunos casos, el agente para controlar la osmolaridad de la solución es una sal. En ciertas realizaciones, el agente para controlar la osmolaridad de la solución es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

En otros casos, el agente de iARN se formula como una composición que incluye uno o más agentes de iARN y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso de absorción e isotónicos y similares, que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo,

se contempla el uso del mismo en las composiciones de la invención. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

5 En un caso, la preparación del agente de iARN incluye al menos un segundo agente terapéutico (por ejemplo, un agente que no sea un ARN o un ADN). Por ejemplo, la composición del agente de iARN para el tratamiento de una enfermedad asociada con la TTR, por ejemplo, una amiloidosis hereditaria relacionada con la transtiretina (polineuropatía amiloidótica familiar, PAF), puede incluir un fármaco conocido para la mejora de la PAF, por ejemplo, Tafamidis (INN, o Fx-1006A o Vyndaqel).

10 Una composición del agente de iARN formulada puede asumir una variedad de estados. En algunos ejemplos, la composición es al menos parcialmente cristalina, uniformemente cristalina y/o anhidra (por ejemplo, contiene menos de 80, 50, 30, 20 o 10% de agua). En otro ejemplo, el agente de iARN se encuentra en una fase acuosa, por ejemplo, en una solución que incluye agua.

15 La fase acuosa o las composiciones cristalinas pueden incorporarse a un vehículo de administración, por ejemplo, un liposoma (particularmente para la fase acuosa) o una partícula (por ejemplo, una micropartícula que puede ser apropiada para una composición cristalina). En general, la composición del agente de iARN se formula de forma tal que sea compatible con el método pretendido de administración, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la composición se prepara mediante al menos uno de los siguientes métodos: secado por pulverización, liofilización, secado al vacío, evaporación, secado en lecho fluido o una combinación de estas técnicas; o sonicación con un lípido, secado por congelación, condensación y otro autoensamblado.

20 Una preparación de un agente de iARN puede formularse en combinación con otro agente, por ejemplo, otro agente terapéutico o un agente que estabiliza un agente de iARN, por ejemplo, una proteína que forma un ejemplo con agente de iARN para formar un RNPI. Otros agentes adicionales incluyen quelantes, por ejemplo, EDTA (por ejemplo, para quitar cationes divalentes tales como Mg^{2+}), sales, inhibidores de RNasa tales como RNAsin), etc.

25 En un caso, la preparación del agente de iARN incluye otro compuesto de ARNip, por ejemplo, un segundo agente de iARN que puede mediar iARN con respecto a un segundo gen, o con respecto al mismo gen. Otras preparaciones adicionales pueden incluir al menos 3, 5, diez, veinte, cincuenta o cien o más especies de agente de iARN diferentes. Dichos agentes de iARN pueden mediar la iARN con respecto a un número similar de genes diferentes.

30 Los agentes de iARN de la invención pueden formularse para uso farmacéutico. Las composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más de los agentes de ARNdh en cualquiera de las realizaciones precedentes, cuando se toman solas o se formulan junto con uno o más de portadores (aditivos), excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

35 Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención incluyen la etapa de asociar un agente de iARN de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes secundarios. En general, las composiciones se preparan asociando de manera uniforme y profunda un agente de iARN de la presente invención con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, dar forma al producto.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse específicamente para administración en forma sólida o líquida, incluidas aquellas adaptadas para los siguiente casos: (1) administración oral, por ejemplo, líquidos para emparar (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellas dirigidas a absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril o formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o parche de liberación controlada o pulverización aplicada a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) nasal. La administración mediante el uso de métodos subcutáneos o intravenosos puede ser particularmente ventajosa.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de una opinión médica sólida, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivos u otro problema o complicación, proporcionales con la relación beneficio/riesgo.

50 La frase "portador farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en la presente, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, asistente de fabricación (por ejemplo, lubricante, magnesio de talco, calcio o estearato de cinc o ácido estérico), o un material que encapsula un disolvente, que participa en el transporte del compuesto en cuestión de un órgano o porción del cuerpo a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido que es compatible con los otros ingredientes de las composiciones y no es perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5)

malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes espesantes, tales como polipéptidos y aminoácidos (23) componente de suero, tales como albúmina de suero, HDL y LDL; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones pueden presentarse, de manera conveniente, en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de agente de iARN que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. El agente de iARN que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única generalmente será la cantidad del agente de iARN que produce un efecto deseado, por ejemplo, un efecto terapéutico o profiláctico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad estará en el rango de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de agente de iARN, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

En ciertos casos, una composición de la presente invención comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes de formación de micelas, por ejemplo, ácidos biliares y portadores poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un agente de iARN de la presente invención. En ciertos casos, una composición mencionada anteriormente hace que un agente de iARN de la presente invención esté biodisponible oralmente.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un agente de iARN, es deseable ralentizar la absorción del agente a partir de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse por medio del uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La tasa de absorción del agente de iARN depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de agente de iARN administrada parenteralmente puede lograrse disolviendo o suspendiendo el agente en un vehículo oleoso.

30 *Liposomas*

Un agente de iARN de la invención puede formularse para administración en un ensamblado molecular membranoso, por ejemplo, un liposoma o una micela. Tal como se utiliza en la presente, el término "liposoma" se refiere a una vesícula de lípidos anfílicos dispuestos en al menos una bicapa, por ejemplo, una bicapa o una pluralidad de bicapas. Los liposomas incluyen vesículas unilamerales o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición del agente de iARN. El material lipofílico aísla el interior acuoso de un exterior acuoso, que normalmente no incluye la composición del agente de iARN, a pesar de que en algunos ejemplos, puede hacerlo. Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de ingredientes activos al sitio de acción. Dado que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican los liposomas a un tejido, la bicapa liposomal se fusiona con la bicapa de las membranas celulares. A medida que avanza la fusión del liposoma y la célula, el contenido acuoso interno que incluye el agente de iARN se administra a la célula donde el agente de iARN puede unirse específicamente con un ARN objetivo y puede mediar iARN. En algunos casos, los liposomas también están específicamente dirigidos, por ejemplo, para dirigir el agente de iARN a tipos de células particulares.

Un liposoma contiene un agente de iARN que puede prepararse mediante una variedad de métodos. En un ejemplo, el componente lípido de un liposoma se disuelve en un detergente de forma que se formen micelas con el componente líquido. Por ejemplo, el componente lípido puede ser un lípido catiónico anfipático o un conjugado lípido. El detergente puede tener una concentración de micelas crítica y puede ser no iónico. Detergentes ejemplares incluyen colato, octilglucósido, desoxicolato y lauroil sarcosina. La preparación de agente de iARN se agrega luego a las micelas que incluyen el componente lípido. Los grupos catiónicos en el lípido interactúan con el agente de iARN y se condensan alrededor del agente de iARN para formar un liposoma. Después de la condensación, se quita el detergente, por ejemplo, mediante diálisis, para proporcionar una preparación liposomal de agente de iARN.

En caso de que sea necesario, un compuesto portador que asiste en la condensación puede agregarse durante la reacción de condensación, por ejemplo, mediante adición controlada. Por ejemplo, el compuesto portador puede ser un polímero que no sea un ácido nucleico (por ejemplo, espermina o espermidina). El pH también puede ajustarse para favorecer la condensación.

Los métodos para la producción de vehículos de administración de polinucleótidos estables, que incorporan un complejo de polinucleótidos/lípidos catiónicos como componentes estructurales del vehículo de administración, se describen además, por ejemplo, en el documento WO 96/37194. La formación de liposomas también puede incluir uno o más aspectos de métodos ejemplares descritos en Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Estados Unidos

8:7413-7417, 1987; Pat. de los Estados Unidos No. 4,897,355; Patente de los Estados Unidos No. 5,171,678; Bangham, *et al. M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; y Fukunaga, *et al. Endocrinol.* 115:757, 1984. Las técnicas comúnmente utilizadas para preparar aglomerados lípidos de tamaño apropiado para utilizar como vehículos de administración incluyen sonicación y congelado-descongelado más extrusión (ver, por ejemplo, Mayer, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Se puede utilizar microfluidización cuando se deseen aglomerados consistentemente pequeños (50 a 200 nm) y relativamente uniformes (Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Estos métodos se adaptan fácilmente al empaquetado de las preparaciones de agente de iARN en liposomas.

Los liposomas que son sensibles al pH o de carga negativa atrapan a las moléculas de ácidos nucleicos en vez de formar complejos con éstos. Dado que tanto las moléculas de ácidos nucleicos como el lípido tienen carga similar, ocurre repulsión en vez de formación de complejos. Sin embargo, parte de las moléculas de ácidos nucleicos son atrapadas dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles a pH se han utilizado para administrar el ADN que codifica el gen de quinasa de timidina a monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células objetivo (Zhou *et al., Journal of Controlled Release*, 19, (1992) 269-274).

Un tipo principal de composición liposomal incluye fosfolípidos que no sean fosfatidilcolina derivada de medios naturales. Las composiciones de los liposomas neutros, por ejemplo, pueden formarse de fosfatidilcolina de dimiristoilo (DMPC) o fosfatidilcolina de dipalmitoilo (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman de fosfatidilglicerol de dimiristoilo, mientras que liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente de fosfatidiletanolamina de dioleilo (DOPE). Otro tipo de composición liposomal se forma a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Ejemplos de otros métodos para introducir liposomas en células *in vitro* e *in vivo* incluyen la Pat. de los Estados Unidos No. 5,283,185; la Pat. de los Estados Unidos No. 5,171,678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; y Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

En un caso, se utilizan liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse con la membrana celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficientemente con la membrana de plasma, son captados por los macrófagos *in vivo* y pueden utilizarse para administrar agentes de iARN a macrófagos.

Otras ventajas de liposomas incluyen: los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger los agentes de iARN encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volumen 1, pág. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga de la superficie de lípidos, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Un lípido catiónico sintético de carga positiva, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), puede utilizarse para formar pequeños liposomas que interactúan de manera espontánea con el ácido nucleico para formar complejos de lípidos-ácidos nucleicos que son capaces de fusionarse con los lípidos de carga negativa de las membranas celulares de células de cultivo tisular, resultando en la administración de un agente de iARN (ver, por ejemplo, Felgner, P. L. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos* 8:7413-7417, 1987 y la Pat. de los Estados Unidos No. 4,897,355 para una descripción de DOTMA y su uso con ADN).

Un análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), puede utilizarse en combinación con un fosfolípido para formar vesículas que forman complejos con ADN. Lipofectin™ de Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md. es un agente efectivo para la administración de ácidos nucleicos a células de cultivo de tejido que comprenden liposomas de DOTMA con carga positiva que interactúan espontáneamente con polinucleótidos de carga negativa para formar complejos. Cuando se utilizan suficientes liposomas con carga positiva, la carga neta en los complejos resultantes es positiva. Los complejos de carga positiva preparados de este modo se unen de manera espontánea a las superficies celulares de carga negativa, se fusionan con la membrana de plasma y entregan los ácidos nucleicos funcionales a, por ejemplo, células de cultivo de tejido. Otro lípido catiónico disponible en el mercado, 1,2-bis(oleoiloxi)-3,3-(trimetilamonio)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana) difiere de DOTMA en que los restos de oleilo están unidos por éster, en vez de por conexiones de éter.

Otros compuestos lipídicos catiónicos reportados incluyen aquellos que se han conjugado con una variedad de restos que incluyen, por ejemplo, la carboxiespermina que se ha conjugado con uno de dos tipos de lípidos e incluye compuestos tales como 5-carboxiespermilglicina dioctaoleoilamida ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermil-amida ("DPPES") (ver, por ejemplo, la Pat. de los Estados Unidos No. 5,171,678).

Otro conjugado lípido catiónico incluye la derivatización del lípido con colesterol ("DC-Col") que se ha formulado en liposomas en combinación con DOPE (Ver Gao, X. y Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Se ha informado que la lipopolilisina, realizada conjugando la polilisina con DOPE, es efectiva para la transfección en presencia de suero (Zhou, X. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Para ciertas líneas celulares, se dice que estos liposomas que contienen lípidos catiónicos exhiben toxicidad y proporcionan una transfección más eficiente que las composiciones que contienen DOTMA. Otros productos lípidos catiónicos disponibles en el mercado incluyen DMRIE y DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) y Lipofectamina (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Otros lípidos catiónicos adecuados para la administración de oligonucleótidos se describen en el documento WO 98/39359 y WO 96/37194.

Las formulaciones liposomales son particularmente adecuadas para administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas con respecto a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen menos efectos secundarios relacionados con la absorción sistémica alta del fármaco administrado, mayor acumulación del fármaco administrado en el objetivo deseado y la capacidad de administrar un agente de iARN a la piel. En algunas implementaciones, los liposomas se utilizan para administrar el agente de iARN a células epidérmicas y también para mejorar la penetración del agente de iARN a los tejidos dérmicos, por ejemplo, a la piel. Por ejemplo, los liposomas pueden aplicarse tópicamente. La administración tópica de los fármacos como liposomas a la piel se ha documentado (ver, por ejemplo, Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2,405-410 y du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. y Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. *et al.* *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. *et al.* *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. y Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. y Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 84:7851-7855, 1987).

Los sistemas liposomales no iónicos también han sido examinados para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposomales no iónicas que comprenden Novasome I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter polioxietileno-10-estearílico) y Novasome II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter polioxietileno-10-estearílico) se utilizaron para administrar un fármaco a la dermis de la piel de ratón. Dichas formulaciones con el agente de iARN son útiles para tratar un trastorno dermatológico.

Los liposomas que incluyen un agente de iARN pueden hacerse altamente deformables. Dicha deformabilidad puede hacer que los liposomas penetren a través de los poros que son más pequeños que el radio promedio del liposoma. Por ejemplo, las transferosomas son un tipo de liposomas deformables. Los transferosomas pueden hacerse agregando activadores de borde de superficie, normalmente tensioactivos, a una composición liposomal estándar. Los transferosomas que incluyen el agente de iARN pueden administrarse, por ejemplo, por vía subcutánea por infección con el fin de administrar un agente de iARN a queratinocitos en la piel. Para cruzar la piel de mamífero intacta, las vesículas lipídicas pasan a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro de menos de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Adicionalmente, debido a las propiedades lipídicas, estas transferosomas pueden autooptimizarse (adaptables a la forma de los poros, por ejemplo, en la piel), autorrepararse y pueden frecuentemente alcanzar sus objetivos sin fragmentarse, y a menudo pueden ser autocargables.

Otras formulaciones aplicables a la presente invención se describen en las solicitudes provisionales de los Estados Unidos Nos. de serie: 61/018,616, presentada el 2 de enero de 2008; 61/018,611, presentada el 2 de enero de 2008; 61/039,748, presentada el 26 de marzo de 2008; 61/047,087, presentada el 22 de abril de 2008 y 61/051,528, presentada el 8 de mayo de 2008. La solicitud PCT no. PCT/US2007/080331, presentada el 3 de octubre de 2007 también describe formulaciones que son aplicables a la presente invención.

Tensioactivos

Los tensioactivos tienen un amplio campo de aplicabilidad en formulaciones tales como emulsiones (incluidas las microemulsiones) y liposomas (ver anteriormente). Las composiciones de agente de iARN (o un precursor, por ejemplo un ARN_{idh} que se puede procesar para obtener ARN_{ip}, o un ADN que codifica un precursor de ARN_{ip}) pueden incluir un tensioactivo. En una realización, el ARN_{ip} se formula como una emulsión que incluye un tensioactivo. La forma más común de clasificar y jerarquizar las propiedades de muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, consiste en utilizar el balance de hidrófilos/lipófilos (BHL). La naturaleza del grupo hidrófilo proporciona el medio más útil para categorizar los distintos tensioactivos utilizados en formulaciones (Rieger, en "Pharmaceutical Dosage Forms," Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, 1988, pág. 285).

Si la molécula tensioactiva no se ioniza, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos tienen un amplio campo de aplicabilidad en productos farmacéuticos y se pueden utilizar en un gran rango de valores de pH. En general, sus valores de BHL varían de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitol, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Los alcanolamidas y éteres no iónicos tales como etoxilatos de alcohol graso, alcoholes propoxilados y polímeros de bloques etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los integrantes más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

5 Si la molécula tensioactiva contiene una carga negativa cuando se disuelve o se dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acil lactilatos, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como alquil sulfatos y alquil sulfatos etoxilados, sulfonatos tales como sulfonatos de alquibenceno, acil isetonatos, acil tauratos y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los alquil sulfatos y los jabones.

Si la molécula tensioactiva contiene una carga positiva cuando se disuelve o se dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternarias y aminos etoxiladas. Las sales de amonio cuaternarias son los miembros más utilizados de esta clase.

10 Si la molécula tensioactiva tiene la capacidad para cargar ya sea una carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

El uso de tensioactivos en productos, formulaciones y emulsiones farmacéuticas ha sido reseñado (Rieger, en "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, 1988, pág. 285).

Micelas y otras formulaciones membranosas

15 Los agentes de iARN de la invención también se pueden proporcionar como formulaciones de micelas. Las "micelas" se definen por la presente como un tipo particular de montaje molecular en el cual las moléculas anfipáticas se disponen en una estructura esférica, de forma que todas las porciones hidrófobas de las moléculas quedan dispuestas hacia adentro, con las porciones hidrófilas en contacto con la fase acuosa que lo rodea. Se produce un montaje inverso si el entorno es hidrófobo.

20 Se puede preparar una formulación de micelas mixta adecuada para administrarse a través de membranas transdérmicas al mezclar una solución acuosa de la composición de ARNip, un alquil sulfato de metal alcalino de C₈ a C₂₂ y un compuesto formador de micelas. Entre los ejemplos de compuestos formadores de micelas se incluyen lecitina, ácido hialurónico, sales farmacéuticamente aceptables de ácido hialurónico, ácido glicólico, ácido láctico, extracto de manzanilla, extracto de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, monoleína, monoleatos, 25 monolauratos, aceite de borrajas, aceite de onagra, mentol, trihidroxi oxo colanil glicina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, glicerina, poliglicerina, lisina, polilisina, trioleína, éteres de polioxietileno y análogos de los mismos, éteres de polidocanol alquilo y análogos, quenodesoxicolato, desoxicolato y sus mezclas. Los compuestos formadores de micelas se pueden agregar al mismo tiempo o después de agregar el alquilsulfato de metal alcalino. Las micelas mixtas se formarán básicamente con cualquier tipo de mezcla de ingredientes pero debe producirse un 30 mezclado vigoroso para lograr micelas más pequeñas.

En un primer método se prepara una primera composición de micelas que contiene la composición de ARNip y al menos el alquilsulfato de metal alcalino. La primera composición de micelas se mezcla entonces con al menos tres compuestos formadores de micelas para formar una composición de micelas mixtas. En otro método, la composición 35 de micelas se prepara al mezclar la composición de ARNip, el alquilsulfato de metal alcalino y al menos uno de los compuestos formadores de micelas, seguido de la incorporación del resto de los compuestos formadores de micelas, con un mezclado vigoroso.

40 Se puede agregar fenol y/o m-cresol a la composición de micelas mixta para estabilizar la formulación y protegerla contra el crecimiento de bacterias. Alternativamente, el fenol y/o el m-cresol se pueden agregar con los ingredientes formadores de micelas. Un agente isotónico tal como glicerina también se puede agregar luego de la formación de la composición de micelas mixta.

45 Para administrar la formulación de micelas como pulverización, la formulación se puede introducir en un dispensador de aerosol, y el dispensador se carga con propulsor. El propulsor, que está bajo presión, se encuentra en forma líquida en el dispensador. La relaciones entre los ingredientes se ajustan de forma que las fases acuosa y propulsora se conviertan en una, es decir, que haya una sola fase. Si hay dos fases, es necesario agitar el dispensador antes de dispensar una porción del contenido, por ejemplo, a través de una válvula medida. La dosis dispensada de agente farmacéutico es propulsada desde la válvula medida en una pulverización fina.

Los propulsores pueden incluir clorofluorocarbonos que contengan hidrógeno, fluorocarbonos que contengan hidrógeno, éter dimetilico y éter dietílico. En ciertas realizaciones se puede utilizar HFA 134a (1,1,1,2 tetrafluoroetano).

50 Las concentraciones específicas de los ingredientes esenciales se pueden determinar mediante experimentación relativamente sencilla. Para la absorción a través de las cavidades orales, suele ser deseable aumentar, por ejemplo, al menos duplicar o triplicar, la dosis que se utiliza para la inyección o administración a través del tracto intestinal.

Partículas

55 En otros casos, un agente iARN de la invención se puede incorporar en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas se pueden producir mediante secado por pulverizado, pero se pueden producir

también por otros métodos que incluyen la liofilización, evaporación, secado por lecho fluidizado, secado al vacío o una combinación de dichas técnicas.

IV. Métodos para inhibir la expresión de TTR

5 La presente divulgación también proporciona métodos para inhibir la expresión de una transtiretina (TTR) en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de TTR en la célula y, por lo tanto, inhibir la expresión de TTR en la célula.

10 Poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble hebra, puede realizarse in vitro o in vivo. Poner en contacto una célula in vivo con el agente de iARN comprende poner en contacto una célula o grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, con el agente de iARN. Las combinaciones de métodos in vitro e in vivo para poner en contacto una célula también son posibles. Poner en contacto una célula puede ser un proceso directo o indirecto, tal y como se describió anteriormente. Además, el contacto de una célula se puede lograr dirigiéndose a un ligando, incluido cualquier ligando descrito en la presente o conocido en la técnica. En casos preferidos, el ligando de direccionamiento es un resto de carbohidratos, por ejemplo un ligando GalNAc₃ o cualquier otro ligando que dirija el agente de iARN al sitio de interés, por ejemplo, el hígado del sujeto.

El término "inhibir", tal como se utiliza en la presente, se utiliza indistintamente con "reducir", "silenciar", "regular por disminución", "eliminar" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

20 La frase "inhibir la expresión de un TTR" se refiere a la inhibición de la expresión de cualquier gen de la TTR (tal como, por ejemplo, un gen TTR de ratón, un gen de la TTR de rata, un gen de la TTR de ratón o un gen de la TTR humana), así como las variantes o mutantes de un gen de la TTR. Por lo tanto, el gen de la TTR puede ser un gen de la TTR natural, un gen de la TTR mutante (como ser un gen de la TTR mutante que dé lugar a una deposición amiloide) o un gen de la TTR transgénico en el contexto de una célula, grupo de células u organismo manipulado genéticamente.

"Expresión inhibidora de un gen de la TTR" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de la TTR, por ejemplo, al menos una eliminación parcial de la expresión de un gen de la TTR. La expresión del gen de la TTR se puede evaluar en relación al nivel o cambio en el nivel de cualquier variable asociada con la expresión genética de la TTR, por ejemplo, nivel de ARNm de la TTR, nivel proteico de la TTR o el número o extensión de los depósitos amiloides. Este nivel se puede evaluar en una célula individual o en un grupo de células, incluida, por ejemplo, una muestra extraída de un sujeto.

35 La inhibición se puede evaluar mediante un descenso en el nivel absoluto o relativo de una o más variables asociadas con la expresión de la TTR, comparado con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utilice en la técnica, por ejemplo, nivel de base de referencia predosis o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no haya sido tratado o que haya sido tratado con un testigo (como ser, por ejemplo, testigo únicamente de tampón o testigo de agente inactivo).

40 En algunos casos de los métodos, la expresión de un gen de la TTR es inhibida al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos alrededor de un 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99%.

50 La inhibición de la expresión de un gen de la TTR se puede manifestar mediante una reducción de la cantidad de ARNm expresado por una primera célula o grupo de células (dichas células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra extraída de un sujeto) en el cual un gen de la TTR se transcribe y que se trata o se ha tratado (por ejemplo, mediante el contacto de la célula o células con un agente de iARN de la invención, o mediante la administración de un agente de iARN de la invención a un sujeto en el que las células están o estuvieron presentes) de forma que la expresión de un gen de la TTR se vea inhibida, en comparación con un segundo grupo de células básicamente idénticas a la primera célula o grupo de células, pero que no ha o han sido tratados (célula(s) testigo). En realizaciones preferidas, la inhibición se evalúa mediante la expresión del nivel de ARNm en células tratadas como porcentaje del nivel de ARNm en células testigo, mediante el uso de la siguiente fórmula:

(ARNm en células testigo) - (ARNm en células tratadas) • 100%
 (ARNm en células testigo)

Alternativamente, la inhibición de la expresión de un gen de la TTR se puede evaluar en términos de una reducción de un parámetro ligado funcionalmente a la expresión genética de la TTR, por ejemplo, expresión proteica de la TTR, nivel de proteína de unión de retinol, nivel de vitamina A o presencia de depósitos amiloides que comprendan TTR. El silenciamiento del gen de la TTR puede determinarse en cualquier célula que exprese TTR, ya sea constitutivamente o mediante ingeniería genómica, y por cualquier ensayo conocido en la técnica. El hígado es el mayor sitio de expresión de la TTR. Otros sitios significativos de expresión incluyen el plexo coroideo, la retina y el páncreas.

La inhibición de la expresión de una proteína TTR se puede manifestar mediante una reducción en el nivel de la proteína TTR que es expresada por una célula o grupo de células (por ejemplo, el nivel de proteína expresada en una muestra extraída de un sujeto). Como se explicó anteriormente para la evaluación de la eliminación de ARNm, la inhibición de los niveles de expresión proteica en una célula o grupo de células tratadas puede expresarse de forma similar al porcentaje del nivel de proteína en una célula o grupo de células testigo.

Se puede utilizar una célula o un grupo de células testigo para evaluar la inhibición de la expresión de un gen de la TTR, e incluye una célula o grupo de células que no se ha puesto en contacto aún con un agente de iARN de la invención. Por ejemplo, la célula o grupo de células testigo se puede extraer de un sujeto individual (por ejemplo, un sujeto humano o animal) previo al tratamiento del sujeto con un agente de iARN.

El nivel de ARNm de la TTR expresado por una célula o grupo de células, o el nivel de ARNm de la TTR en circulación se puede determinar mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica para evaluar la expresión de ARNm. En una realización, el nivel de expresión de la TTR en una muestra se determina mediante la detección de un polinucleótido transcrito, o una porción de él, por ejemplo, ARNm del gen de la TTR. Se puede extraer el ARN de las células mediante técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de extracción ácida por isotiocianato de fenol/guanidina (ARNzol B; Biogenesis), kits de preparación de ARN RNeasy (Qiagen) o PAXgene (PreAnalytix, Suiza). Los formatos típicos de ensayos que utilizan hibridación de ácido ribonucleico incluyen ensayos de ejecución nuclear (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035), transferencia Northern, hibridación *in situ* y análisis de microarreglo. El ARNm de TTR en circulación se puede detectar mediante el uso de métodos descritos en PCT/US2012/043584, cuyo contenido completo se incorpora a la presente a modo de referencia.

En un caso, el nivel de expresión de la TTR se determina mediante el uso de una sonda de ácido nucleico. El término "sonda", tal como se utiliza en la presente se refiere a cualquier molécula capaz de enlazarse selectivamente a una TTR específica. Un experto en la técnica puede sintetizar una sonda, o derivarla de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas se pueden diseñar específicamente para ser etiquetadas. Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, a modo no taxativo, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, a modo no taxativo, análisis Southern y Northern, análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y arreglos de sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm involucra el contacto del ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se puede hibridar a ARNm de TTR. En una realización, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo al introducir el ARNm aislado en un gel de agarosa y transferir el ARNm del gel a una membrana, como ser nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un arreglo de chip de genes Affymetrix. El experto en la materia puede adaptar fácilmente los métodos conocidos de detección de ARNm para su utilización a la hora de determinar el nivel de ARNm de TTR.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de la TTR en una muestra involucra el proceso de amplificación de ácido nucleico y/o transcriptasa inversa (para preparar ADNc) o por ejemplo ARNm en la muestra, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental presentada en Mullis, 1987, Patente de los Estados Unidos No. 4,683,202), reacción en cadena de ligasa (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), autorreplicación de secuencia sostenida (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación de círculo rodante (Lizardi et al., Pat. de los Estados Unidos No. 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas mediante el uso de técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas. En aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de la TTR se determina mediante RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, el sistema TaqMan™).

5 Los niveles de expresión de ARNm de la TTR se pueden monitorear mediante el uso de una transferencia de membrana (tal como la que se utiliza en análisis de hibridación tales como Northern, Southern, de punto y similares) o micropocillos, tubos de ensayo, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprende ácidos nucleicos unidos). Ver las Pat. de los Estados Unidos Nos. 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 y 5,445,934, que se incorporan a la presente a modo de referencia. La determinación de la expresión del nivel de la TTR también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En casos preferidos, el nivel de la expresión de ARNm se evalúa mediante el uso de ensayos de ADN ramificado o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de estos métodos se describe y ejemplifica en los Ejemplos presentados en la presente.

10 El nivel de expresión de la proteína TTR se puede determinar mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica para la medición de niveles de proteína. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electrofóresis, electrofóresis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitación de fluido o gel, espectroscopía de absorción, ensayos colorimétricos, inmunolectrofóresis, técnica de transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, ensayos de electroquimioluminiscencia y similares.

15 En algunos casos, la eficacia de los métodos se puede monitorear mediante la detección o monitoreo de una reducción en un depósito de TTR amiloide. Reducir un depósito de TTR amiloide, tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier reducción en el tamaño, número o gravedad de los depósitos de TTR, o a una prevención o reducción en la formación de depósitos de TTR, dentro de un órgano o área de un sujeto, tal y como se puede evaluar in vitro o in vivo mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, algunos métodos de evaluación de depósitos amiloides se describen en Gertz, M.A. & Rajukumar, S.V. (Editores) (2010), *Amyloidosis: Diagnosis and Treatment*, Nueva York: Humana Press. Los métodos para evaluar los depósitos amiloides pueden incluir análisis bioquímicos, así como evaluaciones visuales o computarizadas de depósitos amiloides, tal como se hace visible, por ejemplo, mediante el uso de la tinción inmunohistoquímica, etiquetado fluorescente, microscopía óptica, microscopía electrónica, microscopía fluorescente u otros tipos de microscopía. Se pueden emplear modalidades de imagen invasivas o no invasivas, incluidas, por ejemplo, formación de imágenes mediante TC, PET o NMR/MRI para evaluar los depósitos amiloides.

20 Los métodos pueden llegar a reducir los depósitos de TTR en cualquier cantidad de tejidos o regiones del cuerpo que incluyen, a modo no taxativo, corazón, hígado, bazo, esófago, estómago, intestino (íleon, duodeno y colon), cerebro, nervio ciático, ganglio de la raíz dorsal, riñón y retina.

25 El término "muestra", tal como se usa en la presente, se refiere a una recolección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, de plasma, linfáticos, orina, fluido cerebroespinal, saliva, fluidos oculares y similares. Las muestras de tejidos pueden incluir muestras de tejidos, órganos o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar particularmente de órganos, partes de órganos o fluidos o células dentro de esos órganos. En ciertas realizaciones, las muestras se pueden derivar del hígado (por ejemplo, el hígado completo o ciertos segmentos del hígado o ciertos tipos de células en el hígado, tal como, por ejemplo, hepatocitos), la retina o partes de la retina (por ejemplo, epitelio pigmentario retinal), el sistema nervioso central o partes del sistema nervioso central (por ejemplo, ventrículos o plexo coroideo) o el páncreas o ciertas células o partes del páncreas. En casos preferidos, una "muestra derivada de un sujeto" refiere a sangre o plasma extraídos del sujeto. En realizaciones posteriores, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a tejido hepático o tejido de la retina derivado del sujeto.

30 En algunos casos de los métodos, el agente de iARN se administra a un sujeto de forma que el agente de iARN se lleve a un lugar específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión de la TTR se puede evaluar mediante la medición del nivel o cambio en el nivel de ARNm de TTR o proteína TTR en una muestra derivada de un fluido o tejido del lugar específico dentro del sujeto. En realizaciones preferidas, el lugar se selecciona del grupo que consiste en hígado, plexo coroideo, retina y páncreas. El lugar puede ser también una subsección o subgrupo de células de cualquiera de los lugares ya mencionados (por ejemplo, hepatocitos o epitelio pigmentario retinal). El lugar también incluye células que expresan un tipo particular de receptor (por ejemplo, hepatocitos que expresan el receptor de asialoglicoproteínas).

V. Métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TTR en un sujeto. Los métodos incluyen la administración al sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente de iARN de la invención.

55 Tal como se utiliza en la presente, un "sujeto" incluye ya sea a un humano o a un animal no humano, preferiblemente un vertebrado, y más preferiblemente un mamífero. Un sujeto puede incluir un organismo transgénico. Más preferiblemente, el sujeto es un humano, tal como un humano que padece de o está predispuesto a desarrollar una enfermedad asociada a TTR.

En algunos casos, el sujeto sufre de una enfermedad asociada a TTR. En otras realizaciones, el sujeto es un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a TTR, por ejemplo, un sujeto con una mutación del gen de la TTR asociada con el desarrollo de una enfermedad asociada a TTR, un sujeto con un historial familiar de enfermedades asociadas a TTR o un sujeto que presenta signos o síntomas que sugieren el desarrollo de una amiloidosis por TTR.

Una "enfermedad asociada a TTR", tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier enfermedad provocada por o asociada a la formación de depósitos amiloides en el que los precursores fibrilares consisten en proteínas de TTR variantes o tipo salvaje. Los TTR mutantes o tipo salvaje dan lugar a varias formas de deposición amiloide (amiloidosis). La amiloidosis implica la formación y agregado de proteínas mal plegadas, que resulta en depósitos extracelulares que obstaculizan las funciones de los órganos. Los síndromes clínicos asociados con la aglomeración de TTR incluyen, por ejemplo, amiloidosis sistémica senil (ASS); amiloidosis sistémica familiar; polineuropatía amiloidótica familiar (PAF); cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF); y amiloidosis leptomeníngea, también conocida como amiloidosis meningio cerebrovascular, amiloidosis del sistema nervioso central (CNS) o amiloidosis tipo VII.

En algunas implementaciones de los métodos de la invención, los agentes de iARN de la invención se administran a sujetos que padecen cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF) y amiloidosis sistémica senil (ASS). La TTR de secuencia normal provoca amiloidosis cardíaca en personas de edad avanzada, y se llama amiloidosis sistémica senil (ASS) (también llamada amiloidosis cardíaca senil (ACS) o amiloidosis cardíaca). La ASS suele estar acompañada de depósitos microscópicos en muchos otros órganos. Las mutaciones de TTR aceleran el proceso de formación de amiloides de TTR y son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de amiloidosis por TTR clínicamente significativa (también llamada ATTR (amiloidosis de tipo transtiretina)). Se sabe que hay más de 85 variantes amiloidogénicas de TTR que provocan amiloidosis familiar.

En algunos casos de los métodos de la invención, los agentes de iARN de la invención se administran a sujetos que sufren polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) asociada a la transtiretina (TTR). Dichos sujetos pueden sufrir manifestaciones oculares, tales como opacidad vítrea y glaucoma. Los expertos en la materia saben que la transtiretina amiloidogénica (ATTR) sintetizada por el epitelio pigmentario retinal (EPR) tiene un papel importante en la evolución de la amiloidosis ocular. En estudios previos se ha demostrado que la fotocoagulación panretiniana con láser, que reduce las células de EPR, previene la evolución de la deposición amiloide en el vítreo, lo que indica que la supresión efectiva de la expresión de ATTR en EPR puede convertirse en una nueva terapia para la amiloidosis ocular (ver, por ejemplo, Kawaji, T., y otros, *Ophthalmology*. (2010) 117: 552-555). Los métodos de la invención son útiles para el tratamiento de manifestaciones oculares de PAF relacionada con TTR, por ejemplo, amiloidosis ocular. El agente de iARN puede llevar de forma apropiada para dirigirse a un tejido en particular, tal como el ojo. Entre los modos de administración ocular se incluye la inyección en los párpados retrobulbar y subcutánea, subconjuntival, bajo la cápsula de Tenon, de la cámara anterior o intravítrea (o inyección o infusión interna). Las formulaciones específicas para la administración ocular incluyen gotas para los ojos o pomadas.

Otra enfermedad asociada a TTR es la hipertiroxinemia, también conocida como "hipertiroxinemia disranstiretinémica" o "hipertiroxinemia disprealbuminémica". Este tipo de hipertiroxinemia puede ser secundario a un aumento en la asociación de tiroxina con TTR debido a una molécula mutante de TTR con afinidad aumentada por la tiroxina. Ver, por ejemplo, Moses et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 86, 2025-2033.

Los agentes de iARN de la invención se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier modo de administración conocido en la técnica, que incluye pero no se limita al subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraocular, intrabronquial, intrapleural, intraperitoneal, intrarterial, linfático, cerebrospinal y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, los agentes se administran de forma subcutánea.

En algunos casos, la administración se produce a través de una inyección en depósito. Una inyección en depósito puede liberar el agente de iARN de forma consistente en un período de tiempo prolongado. De esta forma, una inyección de depósito puede reducir la frecuencia de las dosis necesarias para obtener un efecto deseado, por ejemplo, una inhibición deseada de la TTR o un efecto terapéutico o profiláctico. Una inyección de depósito también puede proporcionar concentraciones de suero más consistentes. Las inyecciones de depósito pueden incluir inyecciones subcutáneas o inyecciones intramusculares. En casos preferidos, la inyección de depósito es una inyección subcutánea.

En algunos casos, la administración se realiza a través de una bomba. La bomba puede ser una bomba exterior o una bomba implantada quirúrgicamente. En determinados casos, la bomba es una bomba osmótica implantada subcutáneamente. En otros casos, la bomba es una bomba de infusión. Una bomba de infusión se puede utilizar para infusiones intravenosas, subcutáneas, arteriales o epidurales. En casos preferidos, la bomba de infusión es una bomba de infusión subcutánea. En otros casos, la bomba es una bomba implantada quirúrgicamente que lleva el agente de iARN al hígado.

Otros modos de administración incluyen la administración epidural, intracerebral, intracerebroventricular, administración nasal, intrarterial, intracardiaca, infusión intraósea, intratecal, intravítrea y pulmonar. El modo de

administración se puede elegir en base a si se desea un tratamiento local o sistémico y en base al área que se va a tratar. La vía y el sitio de administración se pueden elegir para mejorar la determinación del objetivo.

5 En algunos casos, el agente de iARN se administra a un sujeto en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en una célula dentro del sujeto. La cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en una célula dentro de un sujeto se puede evaluar mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, incluidos los métodos que involucran la evaluación de la inhibición de ARNm de TTR, proteína de TTR o las variables relacionadas, tales como los depósitos amiloides.

En algunos casos, el agente de iARN se administra a un sujeto en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva.

10 "Cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se utiliza en la presente, incluye la cantidad de agente de iARN que, cuando es proporcionado a un paciente para tratar una enfermedad asociada a TTR, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, mediante disminución, mejora o mantenimiento de la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede variar dependiendo del agente de iARN, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y la historia, edad, peso, historia familiar, composición genética, etapa del proceso patológico mediado por la expresión de TTR, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del paciente a tratar.

15 "Cantidad profilácticamente efectiva", tal como se utiliza en la presente, incluye la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administra a un sujeto que no ha experimentado o mostrado aún síntomas de una enfermedad asociada a TTR, pero que puede estar predispuesto a la enfermedad, es suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. Los síntomas que se pueden mejorar incluyen neuropatía sensorial (por ejemplo, parestesia, hipoestesia en extremidades distales), neuropatía autonómica (por ejemplo disfunción gastrointestinal, como ser úlcera gástrica o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, IMCm (Índice de Masa Corporal modificado) considerablemente reducido, disfunción del nervio craneano y distrofia corneal reticular. La mejora de la enfermedad incluye la ralentización del curso de la enfermedad o la reducción de la gravedad de la enfermedad que se desarrolla posteriormente. La "cantidad profilácticamente efectiva" puede variar dependiendo del agente de iARN, de cómo se administra el agente, del grado o riesgo de la enfermedad y de la historia, edad, peso, historia familiar, composición genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si hubiera, y otras características individuales del paciente a tratar.

20 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" también incluye una cantidad de agente de iARN que produce efectos locales o sistémicos deseados en una relación entre beneficio/riesgo razonable y aplicable a cualquier tratamiento. Los agentes de iARN aplicados en los métodos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad suficiente para producir una relación entre beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

25 Tal como se utiliza en la presente, las frases "cantidad terapéuticamente efectiva" y "cantidad profilácticamente efectiva" también incluyen una cantidad que proporciona un beneficio en el tratamiento, la prevención o la gestión de los procesos patológicos o de los síntomas de procesos patológicos mediados por la expresión de TTR. Los síntomas de la amiloidosis por TTR incluyen neuropatía sensorial (por ejemplo, parestesia, hipoestesia en extremidades distales), neuropatía autonómica (por ejemplo disfunción gastrointestinal, como ser úlcera gástrica o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, IMCm (Índice de Masa Corporal modificado) considerablemente reducido, disfunción del nervio craneano y distrofia corneal reticular.

30 La dosis de agente de iARN que se administra a un sujeto se puede adaptar para equilibrar los riesgos y beneficios de una dosis determinada, por ejemplo, para lograr un nivel deseado de supresión del gen TTR (como se evalúa, por ejemplo, en base a la supresión de ARNm de TTR, expresión de proteína TTR, o una reducción en el depósito amiloide, tal y como se lo define anteriormente) o un efecto terapéutico o profiláctico deseado, mientras que al mismo tiempo se evitan los efectos secundarios no deseados.

35 En un caso, el agente de iARN se administra en una dosis de entre aproximadamente 0.25 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 0.5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg o entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

5 En algunos casos, el agente de iARN se administra a una dosis de aproximadamente 0.25 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 21 mg/kg, aproximadamente 22 mg/kg, aproximadamente 23 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, 10 aproximadamente 33 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg.

15 En algunos casos, el agente de iARN se administra en dos o más dosis. Si se desea facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, se puede aconsejar la implantación de un dispositivo de administración, por ejemplo, una bomba, un stent semipermanente (por ejemplo, intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un depósito. En algunos casos, el número o cantidad de las dosis posteriores depende de si se logra un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen TTR, o si se logra un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, la reducción de un depósito amiloide o la reducción de un síntoma de una enfermedad asociada a TTR. En algunas realizaciones, el agente de iARN se administra de acuerdo con un esquema. Por ejemplo, se puede administrar el agente de iARN 20 dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana o cinco veces por semana. En algunos casos, el esquema involucra administraciones espaciadas regularmente, por ejemplo, cada hora, cada cuatro horas, cada seis horas, cada ocho horas, cada doce horas, cada día, cada dos días, cada tres días cada cuatro días cada 25 cinco días, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente. En otros casos, el esquema involucra administraciones cada intervalos de tiempo muy cortos, seguidos de un período más largo de tiempo durante el cual el agente no se administra. Por ejemplo, el programa puede involucrar un conjunto inicial de dosis que se administran en un período relativamente corto de tiempo (por ejemplo, cada 6 horas aproximadamente, cada 12 horas aproximadamente, cada 24 horas aproximadamente, cada 48 horas aproximadamente o cada 72 horas 30 aproximadamente) seguido de un período de tiempo más largo (por ejemplo, una semana aproximadamente, dos semanas aproximadamente, tres semanas aproximadamente, cuatro semanas aproximadamente, cinco semanas aproximadamente, seis semanas aproximadamente, siete semanas aproximadamente u ocho semanas aproximadamente) durante el cual el agente de iARN no se administra. En un caso, el agente de iARN se administra a cada hora inicialmente y luego se administra cada intervalos más largos de tiempo (por ejemplo, a diario, 35 semanalmente, cada dos semanas o mensualmente). En otro caso, el agente de iARN se administra a diario y luego se administra cada intervalos más largos de tiempo (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente). En algunos casos, el intervalo más largo aumenta con el tiempo o se determina en base al logro de un efecto deseado. En un caso específico, el agente de iARN se administra una vez, a diario, durante una primera semana, seguido de dosis semanales que comienzan en el octavo día de la administración. En otro caso específico, 40 el agente de iARN se administra cada dos días durante una primera semana, seguido de dosis semanales que comienzan en el octavo día de la administración.

Cualquiera de estos esquemas puede repetirse opcionalmente para una o más iteraciones. El número de iteraciones puede depender del logro de un efecto deseado, por ejemplo, la eliminación de un gen de la TTR, el nivel de proteína de unión de retinol, el nivel de vitamina A y/o si se logra un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, la 45 reducción de un depósito amiloide o la reducción de un síntoma asociado a TTR.

En algunos casos, el agente de iARN se administra con otros agentes terapéuticos u otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, otros agentes u otros regímenes terapéuticos apropiados para el tratamiento de una enfermedad asociada a TTR pueden incluir trasplante de hígado, que puede reducir los niveles de TTR mutante en el cuerpo; Tafamidis (Vyndaqel), que estabiliza cinéticamente el tetrámero de TTR, mediante la prevención de la disociación 50 del tetrámero necesaria para la amiloidogénesis de TTR; y los diuréticos, que pueden emplearse, por ejemplo, para reducir edemas en amiloidosis por TTR con compromiso cardíaco.

En un caso, se le administra a un sujeto una dosis inicial y una o más dosis de mantenimiento de un agente de iARN. Las dosis de mantenimiento pueden ser iguales o más bajas que la dosis inicial, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir tratar el sujeto con una o más dosis que están en el rango de 55 0.01 µg a 15 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, 10 mg/kg, 1 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.001 mg/kg o 0.00001 mg/kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, por ejemplo, no más de una vez cada dos días, una vez cada cinco días, una vez cada siete días, una vez cada diez días, una vez cada catorce días, una vez cada veintidós días o una vez cada treinta días. Además, el régimen de tratamiento puede durar por un período de tiempo que variará de acuerdo con la naturaleza de la enfermedad específica, su gravedad y la condición general del paciente. En algunos casos la dosis se puede administrar no más de una vez por día, por ejemplo, no más de una vez cada 24, 36, 48 o más horas, por ejemplo, no más de una vez cada 5 u 8 días. Luego del 60 tratamiento, se puede monitorear al paciente para evaluar los cambios en su condición. La dosis de agente de iARN puede aumentar en el caso de que el paciente no responda significativamente a esos niveles de dosis, o reducirse si

se observa un alivio en los síntomas del estado de enfermedad, si el estado de enfermedad ha sido eliminado o si se observan efectos secundarios no deseados.

VI. Kits

La presente divulgación proporciona también kits para poner en práctica cualquiera de los métodos de la invención. Dichos kits incluyen uno o más agentes de iARN e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para inhibir la expresión de una TTR en una célula al poner en contacto la célula con el o los agente(s) de iARN en una cantidad efectiva para inhibir la expresión del TTR. Los kits pueden además comprender medios para poner en contacto la célula con el agente de iARN (por ejemplo, un dispositivo de inyección) o medios para medir la inhibición de TTR (por ejemplo, medios para medir la inhibición de ARNm de TTR o proteína de TTR). Dichos medios para medir la inhibición de TTR pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits pueden además, opcionalmente, comprender medios para administrar los agentes de iARN a un sujeto o medios para determinar la cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva.

Se ilustra la invención además a través de los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como restrictivos.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1: Inhibición de TTR con conjugados de TTR-GalNAc

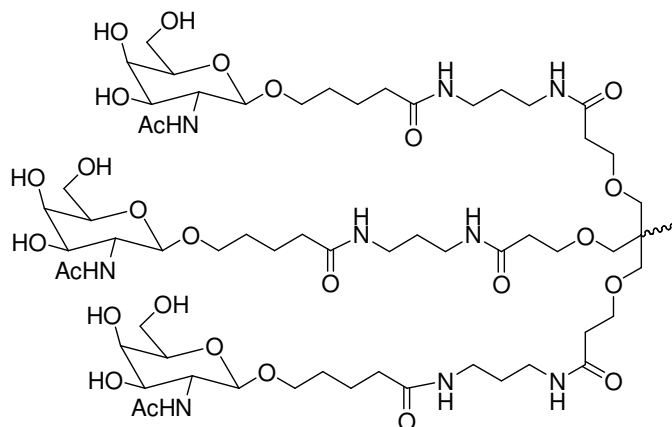
Se administró por vía subcutánea a los ratones una sola dosis del agente de iARN de la TTR AD-43527 y los niveles del ARNm de la TTR se determinaron 72 horas después de la administración.

El conjugado con GalNAc de reacción cruzada de ratón/rata, AD-43527, se eligió para evaluación in vivo en ratones C57BL/6 tipo salvaje para silenciar el ARNm de la TTR en el hígado. La secuencia de cada hebra de AD-43527 se muestra a continuación.

Hebra: s= sentido; as=antisentido

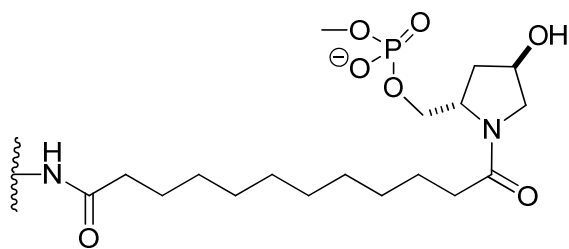
No. de Dúplex	Hebra	No. de oligo	Secuencia 5' a 3'
AD-43527	s	A-89592	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAfL96 (SEQ ID NO: 8)
	as	A-83989	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu (SEQ ID NO: 9)
			L96 = GalNAc ₃ ; nts en minúscula (a,u,g,c) son nucleótidos 2'-O-metilo, Nf (es decir, Af) es un nucleótido 2'-fluoro

El ligando utilizado fue GalNAc₃:

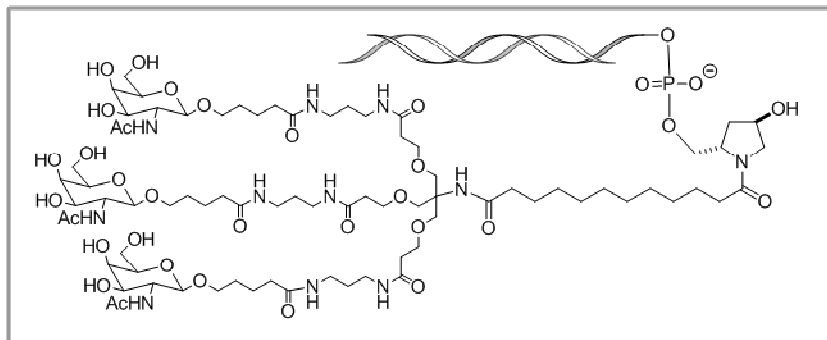


25

Este ligando GalNAc₃ se conjugó con el extremo 3' de la hebra sentido usando el enlazante y enlace tal como se muestra a continuación:



La estructura de la hebra sentido conjugada de GalNAc₃ resultante se muestra en el siguiente esquema:



- 5 Se sintetizaron y ensayaron agentes de iARN adicionales que se dirigen a la TTR y tienen las siguientes secuencias y modificaciones.

Agentes de iARN de la TTR de reacción cruzada de ratón/rata

No. de Dúplex	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 5'-3'
AD-43528	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAfQ11L96 (SEQ ID NO:10)	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu (SEQ ID NO:11)

- 10 Agentes de iARN de la TTR de reacción cruzada de humano/cynomolgus; el dúplex base es AD-18328 [que tiene una secuencia 5'-3' de hebra sentido de GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT (SEQ ID NO: 12) y secuencia 5' a 3' de hebra antisentido de AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT (SEQ ID NO: 13) con las siguientes modificaciones: 2'F/2'OMe w/2 PS en AS alternas.

No. de Dúplex	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 5'-3'
AD-45163	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfL96 (SEQ ID NO: 14)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa (SEQ ID NO: 16)
AD-45164	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfQ11L96 (SEQ ID NO: 15)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa (SEQ ID NO:17)

- 15 L96 = GalNAc₃; nts en minúscula (a,u,g,c) son nucleótidos 2'-O-metilo, Nf (es decir, Af) es un nucleótido 2'-fluoro; Q11 es colesterol; s es fosforotioato.

- 20 AD-43527 se administró a ratones hembra C57BL/6 (6-10 semanas, 5 por grupo) por inyección subcutánea a un volumen de dosis de 10µl/g a una dosis de 30, 15, 7.5, 3.5, 1.75 o 0.5 mg/kg de AD-43527. Los animales testigo recibieron PBS por inyección subcutánea al mismo volumen de dosis.

Después de aproximadamente setenta y dos horas, los ratones se anestesiaron con 200 µl de cetamina, y luego se desangraron al cortarse la arteria caudal derecha. Se recolectó el tejido del hígado, se congeló rápidamente y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

5 La eficacia del tratamiento se evaluó mediante medición del ARNm de la TTR en el hígado a las 72 horas post-dosis. Los niveles de ARNm de TTR en el hígado se ensayaron utilizando los ensayos de ADN Ramificado- QuantiGene 1.0 (Panomics). En resumen, las muestras de hígado de ratón se molieron y se prepararon lisados de tejido. La mezcla de lisis de hígado (una mezcla de 1 volumen de mezcla de lisis, 2 volúmenes de agua libre de nucleasa y 10µl de Proteinasa-K/ml para una concentración final de 20mg/ml) se incubó a 65°C durante 35 minutos. 5µl de lisado de hígado y 95µl de un conjunto de sonda funcional (sonda de TTR para direccionamiento de genes y GAPDH para control endógeno) se agregaron a la Placa de Captura. Las Placas de Captura se incubaron a 53°C ± 1°C (aprox. 16-20hrs). Al día siguiente, las Placas de Captura se lavaron 3 veces con 1X de Tampón de Lavado (agua libre de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), luego se secaron mediante centrifugado durante 1 minuto a 240g. Se agregaron 100µl de mezcla de Sonda Amplificadora por pocillo a la Placa de Captura, que se selló con una lámina de aluminio y se incubó durante 1 hora a 46°C ± 1°C. Luego de 1 hora de incubación, se repitió la etapa de lavado, luego se agregaron 100µl de la mezcla de Sonda de Etiqueta por pocillo. Las Placas de Captura se incubaron a 46°C ± 1°C durante 1 hora. Luego se lavaron las placas con 1X de Tampón de Lavado, se secaron y se agregaron 100µl de sustrato por pocillo a las Placas de Captura. Las Placas de Captura se incubaron durante 30 minutos a 46°C seguida por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se leyeron usando el Luminómetro SpectraMax luego de la incubación. Se analizaron los datos del ADNb restando el fondo promedio de cada muestra por duplicado, promediando los valores resultantes de GAPDH por duplicado (sonda testigo) y la TTR (sonda experimental) y luego se computó la relación: (sonda experimental-fondo)/(sonda testigo-fondo). El nivel de ARNm de la TTR promedio se calculó para cada grupo y se normalizó al grupo de PBS promedio para proporcionar el ARNm de la TTR relativo como un % del grupo testigo de PBS.

15 Los resultados se muestran en la Figura 1. El agente de iARN conjugado con GalNAc que se dirige a la TTR tuvo una DE₅₀ de aproximadamente 5 mg/kg para la desactivación del ARNm de la TTR. Estos resultados demuestran que los agentes de iARN conjugados de GalNAc que se dirigen a la TTR son efectivos para inhibir la expresión del ARNm de la TTR.

Ejemplo 2: La inhibición de TTR con conjugados de TTR-GalNAc es durable

30 Se les administró a los ratones una dosis subcutánea (7.5 o 30.0 mg/kg) de AD-43527, un agente de iARN conjugado con GalNAc que se dirige a la TTR. Los niveles de ARNm de la TTR en el hígado se evaluaron 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 19, 26, 33 y 41 días después del tratamiento mediante el uso del método que se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Figura 2. El día 19, la administración de 30.0 mg/kg de agentes de iARN conjugados con GalNAc aún demostraba aproximadamente 50% de silenciamiento. La recuperación total de la expresión ocurrió el día 41.

35 Estos resultados demostraron que la inhibición proporcionada por el ARNi conjugado con GalNAc que se dirige a la TTR es durable, con una duración de hasta 3, 5, 7, 10, 13, 15, 19, 26 o 33 días después del tratamiento.

Ejemplo 3. Síntesis de ARN y apareamiento de dúplex

1. Síntesis de oligonucleótidos

40 Los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador AKTAoligopilot o un sintetizador ABI 394. Se utilizó para la síntesis de oligonucleótidos un soporte sólido de vidrio de poro controlado disponible en el mercado (dT-CPG, 500Å, Síntesis de Cebador) y fosforamiditas de ARN con grupos protectores estándar, 5'-O-dimetoxitritil N6-benzoil-2'-*t*-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-*t*-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N2--isobutril-2'-*t*-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita y 5'-O-dimetoxitritil-2'-*t*-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita (Pierce Nucleic Acids Technologies), a menos que se especifique lo contrario. Las 2'-F fosforamiditas, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-fluro-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidita y 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluro-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidita se adquirieron en (Promega). Todas las fosforoamiditas se utilizaron a una concentración de 0.2M en acetonitrilo (CH₃CN), excepto la guanosina que se utilizó a una concentración de 0.2M en 10% de THF/ANC (v/v). Se utilizó un tiempo de acoplamiento/reciclaje de 16 minutos. El activador fue 5-etil tiotetrazol (0.75M, American International Chemicals); para la oxidación de PO se utiliza Yodo/Agua/Piridina y para la oxidación de PS se utilizó PADS en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

45 Las hebras conjugadas con ligandos se sintetizaron usando un soporte sólido que contenía el ligando correspondiente. Por ejemplo, la introducción de un resto de carbohidrato/ligando (por ejemplo, GalNAc) en el extremo 3' de una secuencia se logró comenzando la síntesis con el soporte sólido de carbohidrato correspondiente. De manera similar, se introdujo un resto de colesterol en el extremo 3' comenzando la síntesis sobre el soporte de colesterol. En general, el resto de ligando se tituló en *trans*-4-hidroxirolinol por medio de un enlace de elección tal como se describe en los ejemplos precedentes para obtener un resto de hidroxiprolinol-ligando. El resto de hidroxiprolinol-ligando se acopló luego con un soporte sólido por medio de un enlazante de succinato o se convirtió

en fosforamidita por medio de las condiciones de fosfitilación estándar para obtener los bloques de construcción de conjugados de carbohidratos deseados. Los ARNip etiquetados con fluoróforos se sintetizaron a partir de la fosforamidita correspondiente o soporte sólido, que se adquirió en Biosearch Technologies. El soporte de polímero oleil litocólico (GalNAc)₃ se realizó internamente a una carga de 38.6 μmol/gramo. El soporte de polímero de Manosa (Man)₃ se realizó internamente a una carga de 42.0 μmol/gramo.

La conjugación del ligando de elección en la posición deseada, por ejemplo, en el extremo 5' de la secuencia, se logró acoplado la fosforamidita correspondiente a la cadena creciente en condiciones de acoplamiento de fosforamidita estándar a menos que se especifique lo contrario. Un acoplamiento de 15 min extendido de 0.1M de solución de fosforamidita en CH₃CN anhidro en presencia del activador de 5-(etiltio)-1*H*-tetrazol a un oligonucleótido unido sólido. La oxidación de la fosfita de internucleótidos al fosfato se realizó usando yodo-agua estándar, tal como se informó en Beaucage, S.L. (2008) Solid-phase synthesis of siRNA oligonucleotides. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 11, 203–216; Mueller, S., Wolf, J. e Ivanov, S.A. (2004) Current Strategies for the Synthesis of RNA. *Curr. Org. Synth.*, 1, 293–307; Xia, J., Noronha, A., Toudjarska, I., Li, F., Akinc, A., Braich, R., Frank-Kamenetsky, M., Rajeev, K.G., Egli, M. y Manoharan, M. (2006) Gene Silencing Activity of siRNAs with a Ribo-difluorotoluyl Nucleotide. *ACS Chem. Biol.*, 1, 176–183, o mediante tratamiento con *tert*-butil hidroperóxido/acetronitrilo/agua (10:87:3) con un oligonucleótido conjugado a un tiempo de espera de oxidación de 10 minutos. El fosforotioato se introduce mediante oxidación de fosfito a fosforotioato usando un reactivo de la transferencia de azufre tal como DDTT (adquirido en AM Chemicals), PADS y/o reactivo Beaucage. La fosforamidita de colesterol se sinterizó internamente y se utilizó a una concentración de 0.1 M en diclorometano. El tiempo de acoplamiento para la fosforamidita de colesterol fue 16 minutos.

2. Desprotección- I (Desprotección de nucleobases)

Después de completarse la síntesis, el soporte se transfirió a una botella de vidrio de 100 mL (VWR). El oligonucleótido se escindió del soporte con desprotección simultánea de los grupos base y de fosfato con 80 mL de una mezcla de amoníaco [amoníaco: etanol (3:1) durante 6.5h a 55°C. La botella se enfrió brevemente sobre hielo y luego la mezcla de amoníaco etanólico se filtró en una nueva botella de 250 ml. EL CPG se lavó con porciones de 2 x 40 mL de etanol/agua (1:1 v/v). El volumen de la mezcla se redujo luego a ~ 30 mL por evaporador rotativo. La mezcla se congeló luego sobre hielo seco y se seca al vacío sobre un Speed Vac.

3. Desprotección-II (Eliminación del grupo 2'-TBDMS)

El residuo seco se resuspendió en 26 mL de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA•3HF) o piridina-HF y DMSO (3:4:6) y se calentó a 60°C durante 90 minutos para quitar los grupos de *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. Luego se aplacó la reacción con 50 ml de acetato de sodio 2mM y pH ajustado a 6.5, y se almacenó en congelador hasta su purificación.

4. Análisis

Los oligonucleótidos se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) antes de la purificación y la selección de tampón y columna depende de la naturaleza de la secuencia y/o ligando conjugado.

5. Purificación por HPLC

Los oligonucleótidos conjugados con ligandos se purificaron por HPLC preparativa de fase inversa. Los oligonucleótidos no conjugados se purificaron por HPLC de intercambio de aniones sobre una columna de gel de TSK cargada en el lugar. Los tampones fueron fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en 10% de CH₃CN (tampón A) y fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en 10% de CH₃CN, NaBr 1M (tampón B). Las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa se agruparon, desalinizaron y liofilizaron. Aproximadamente 0.15 OD de oligonucleótidos desalinizados se diluyeron en agua hasta 150 μL y luego se colocaron en pipetas en viales especiales para CGE y análisis de LC/MS. Los compuestos se analizaron finalmente mediante LC-ESMS y CGE.

6. Preparación del agente de iARN

Para la preparación de una iARN, cantidades equimolares de hebras sentido y antisentido se calentaron en 1xPBS a 95°C durante 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente. La integridad del dúplex se confirmó mediante análisis por HPLC. La Tabla 1 a continuación refleja los agentes de iARN que se dirigen a ARNm de la TTR de humano o roedor.

Tabla 1: Agentes de iARN y resultados de detección sistemática in vitro

ID Dúplex	ID S	SEQ ID NO:	Hebra sentido (S)	ID AS	SEQ ID NO:	Hebra antisentido (AS)	% de ARNm remanente conc. de ARNip				CI50 (nM)
							1 nM	0.1 nM	0.01 nM		
D1000	S1000	18	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuUfcCfasu	AS1000	1110	AfUfgGfaAfuAfcUfcuuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.03	0.1	0.47	0.006	
D1001	S1001	19	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1001	1111	aUfsgGfAfAfuAfcUfcuuG fgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.03	0.10	0.49	0.0065	
D1002	S1002	20	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1002	1112	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGf gsUfuAfcAfcAfcGfsa	0.04	0.10	0.46	0.0068	
D1003	S1003	21	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1003	1113	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGf gUfsuAfcAfcAfcGfsa	0.05	0.12	0.56	0.0073	
D1004	S1004	22	aUGuaACcccAGagUAuu CCcasu	AS1004	1114	AUggAAuaCUcuUGguU AcaUsGsa	0.07	0.13	0.44	0.008	
D1005	S1005	23	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1005	1115	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGf gsUfsuAfcAfcAfcGfsa	0.06	0.11	0.53	0.0093	
D1006	S1006	24	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf AfuUfcCfasUf	AS1006	1116	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf GfuUfcAfcAfcGfsa	0.05	0.16	0.55	0.0095	
D1007	S1007	25	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1007	1117	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfg uuAfcAfcGfsa	0.05	0.14	0.48	0.0098	
D1008	S1008	26	auguaaccaadGadGudAu dAcdGasu	AS1008	1118	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.07	0.11	0.33	0.010	
D1009	S1009	27	UfgGfGfAfuUfuCfAfUfgU	AS1009	1119	uCfuugGfuUfaCfaugAfa	0.03	0.14	0.56	0.0101	

D1010	S1010	28	faAfcCfAfAfgsAf	UfgGfgauUfuCfAfUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	AS1010	1120	AfuCfcCfAfAfgsAf	uCuUfgGfgUfaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.03	0.14	0.65	0.0101
D1011	S1011	29	aUfGfuAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	aUfGfuAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1011	1121	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.06	0.10	0.55	0.011
D1012	S1012	30	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaaacCfAfAfgsAf	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaaacCfAfAfgsAf	AS1012	1122	AfuCfcCfAfAfgsAf	uCuUfgGfgUfaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.04	0.13	0.54	0.0114
D1013	S1013	31	auguaaccaadGadGudAudAcCdGasu	auguaaccaadGadGudAudAcCdGasu	AS1013	1123	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcUfgudGudTadCadTsgsa	0.11	0.19	0.49	0.011
D1014	S1014	32	AfuGfuAaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AfuGfuAaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1014	1124	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfAfgsAf	0.04	0.16	0.59	0.013
D1015	S1015	33	AfuguaAfaCfcAfAfGfaGfuAdTudCcdAsu	AfuguaAfaCfcAfAfGfaGfuAdTudCcdAsu	AS1015	1125	AfuCfcCfAfAfgsAf	dAUdGgdAadTAdCUfcUfuGfgUfuAfcAfAfgsAf	0.07	0.15	0.51	0.013
D1016	S1016	34	auGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	auGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1016	1126	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfAfgsAf	0.05	0.14	0.64	0.013
D1017	S1017	35	UfGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	UfGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	AS1017	1127	AfuCfcCfAfAfgsAf	uCuUfgGfuuaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.09	0.41	0.74	0.0133
D1018	S1018	36	AfuguaAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AfuguaAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1018	1128	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfAfgsAf	0.03	0.14	0.61	0.014
D1019	S1019	37	AfuGfuAfaccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1019	1129	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.02	0.2	0.7	0.014
D1020	S1020	38	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1020	1130	AfuCfcCfAfAfgsAf	asUfsgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfAfgsAf	0.04	0.16	0.67	0.0156
D1021	S1021	39	aUfguAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	aUfguAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1021	1131	AfuCfcCfAfAfgsAf	aUfgGfaAfuUfaCfUfcuuGfGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfAfAfgsAf	0.11	0.24	0.64	0.016

D1022	S1022	40	dTdGggdAdTuudCdAug dTdAacdCdAagsdA	AS1022	1132	udCdTugdGdTudCdAu gdAdAaudCdCcaasdTsc	0.08	0.27	0.64	0.0161
D1023	S1023	41	AfsuGfuAfaCfaAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1023	1133	aUfsgGfAfAfufAfCfUfcuuG fgUfuAfcAfusGfisa	0.03	0.19	0.63	0.0163
D1024	S1024	42	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgua AfcCfaAfgsAf	AS1024	1134	uCuUfgGfuUfaCfaugAf aAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.25	0.69	0.0164
D1025	S1025	43	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgUf AfAfcCfaAfgsAf	AS1025	1135	uCuUfgGfuuaCfaugAfa AfuCfcCfasUfsc	0.04	0.18	0.75	0.0166
D1026	S1026	44	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgUf aAfcCfaAfgsAf	AS1026	1136	uCuUfgGfuUfaCfaugAfa AfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.66	0.0178
D1027	S1027	45	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgUf aAfcCfaAfgsAf	AS1027	1137	uCuUfgGfuUfaCfaugAf aAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.69	0.018
D1028	S1028	46	dAdTgudAdAccdAdAgad GdTaudTdCcaasdT	AS1028	1138	adTdGgadAdTacdTdCu udGdGuudAdCausdGsa	0.15	0.29	0.72	0.018
D1029	S1029	47	AdTGdTAdACdCAdAGd AGdTAdTUdCCdAsU	AS1029	1139	dAUdGGdAAdTAdCUdC UdTGdGUdTAdCAdTsG sdA	0.1	0.27	0.61	0.018
D1030	S1030	48	UfgGfgAfuuuCfaUfUfgUf aAfcCfaAfgsAf	AS1030	1140	uCuUfgGfuUfaCfaugAf AfAfuucCfasUfsc	0.04	0.21	0.64	0.0187
D1031	S1031	49	AfuGfuAfaCfaAfGfaGf uAfuuccAfsu	AS1031	1141	AfuGfgAfAfufAfCfUfCf UfuGfgfuUfaCfaugGfisa	0.06	0.15	0.62	0.019
D1032	S1032	50	AfsuGfuAfaCfaAfGfaGf uAfuucCfasUf	AS1032	1142	asUfgGfAfAfufAfCfUfcuuG fgUfsuAfcAfusGfisa	0.09	0.34	0.78	0.021
D1033	S1033	51	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgUf aacCfaAfgsAf	AS1033	1143	uCuUfgGfuUfufafUfgAf aAfuCfcCfasUfsc	0.06	0.26	0.57	0.0212

D1034	S1034	52	AfuGfuAfaAfccAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1034	1144	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GfuUfcAfcAfcGfsa	0.11	0.39	0.82	0.0216
D1035	S1035	53	UfgGfgAfuUfcCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	AS1035	1145	uCfuUfgGfuUfaCfaugAf AfaUfcCfcCfasUfsc	0.04	0.16	0.56	0.0222
D1036	S1036	54	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUf aAfcCfaAfgsAf	AS1036	1146	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfa AfuUfcCfasUfsc	0.06	0.31	0.78	0.0234
D1037	S1037	55	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUf faAfcCfaAfgsAf	AS1037	1147	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfa AfuUfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.62	0.0235
D1038	S1038	56	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfa facCfaAfgsAf	AS1038	1148	uCfuUfgGfuUfaCfaugAf AfaUfcCfcCfasUfsc	0.09	0.39	0.78	0.0239
D1039	S1039	57	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1039	1149	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.03	0.14	0.59	0.025
D1040	S1040	58	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1040	1150	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.03	0.13	0.56	0.025
D1041	S1041	59	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1041	1151	asUfgGfaAfuAfcUfcuuG fgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.06	0.27	0.79	0.0252
D1042	S1042	60	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfa fAfcCfaAfgsAf	AS1042	1152	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfa AfuCfcCfasUfsc	0.05	0.27	0.67	0.0259
D1043	S1043	61	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uauUfcCfasUf	AS1043	1153	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.02	0.16	0.63	0.027
D1044	S1044	62	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1044	1154	asUfgGfaAfuAfcUfcuuG fgsUfscAfcAfcAfcGfsa	0.06	0.30	0.81	0.0271
D1045	S1045	63	aUfgAfaAfcAfaGfaGf auUfcCfasUf	AS1045	1155	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf GfuUfcCfaUfsgsa	0.12	0.29	0.8	0.028
D1046	S1046	64	AfuGfuAfaCfcAfaGfagu	AS1046	1156	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf	0.03	0.15	0.59	0.030

D1047	S1047	65	AfuUfcCfasUf	UfgGfGfAfuUfuCfaUfgUf AfAfcCfaAfgsAf	AS1047	1157	gUfuAfcAfusGfsa	uCuUfgGfuuaCfaUfgAfa AfuccCfasUfsc	0.44	0.83	0.0324
D1048	S1048	66	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1048	1158	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfg UfuAfcAfusGfsa	0.07	0.23	0.67	0.036	
D1049	S1049	67	AfuGfuAfaAfcAfaGfaGf uAfuuccAfsu	AS1049	1159	AfUfgGfAfaAfuAfcUfcf UfuGfGfuUfuAfcAfusGf sa	0.08	0.23	0.73	0.037	
D1050	S1050	68	UfgGfAfuuuCfaUfgUfaA fcCfaAfgsAf	AS1050	1160	uCuugGfuUfaCfaUfgAf AfaUfcCfasUfsc	0.06	0.29	0.78	0.0372	
D1051	S1051	69	AfuGfuAfaccaagaguAfuU fcCfasUf	AS1051	1161	aUfgGfaAfuAcdTcdTud GgdTuAfcAfusgsa	0.12	0.41	0.86	0.040	
D1052	S1052	70	AfuguAfacAfaGfdAGfdT AdTUdCcdAsu	AS1052	1162	aUfgGfaAfuAfcUfcUfgGf gUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.22	0.72	0.042	
D1053	S1053	71	AfuguAfacAfaGfdAGfdT AdTUdCcdAsu	AS1053	1163	dAUdGGaAfuAfcUfcUf uGfGfuUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.31	0.69	0.044	
D1054	S1054	72	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGd TAfuUfcdCcdAsUf	AS1054	1164	adTdGGfaAfuAfcUfcUf fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.75	0.047	
D1055	S1055	73	AfuguAfacAfaGfaGfdTA dTUdCcdAsu	AS1055	1165	dAUdGGaAadTAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.26	0.7	0.049	
D1056	S1056	74	AuGuAaCcAaGaGuAuU cCasU	AS1056	1166	aUgGaaAuAcUcUuGgUu AcAusGsa	0.08	0.24	0.65	0.050	
D1057	S1057	75	AfuguAfacAfaGfaGfuauU fccasUf	AS1057	1167	aUfgGfaAfuAfcUfcUf uGfGfuUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.42	0.62	0.051	
D1058	S1058	76	AfuGfuAfaccaagaguAfuU	AS1058	1168	aUfgGfaAfuAcdTcdTud	0.12	0.36	0.86	0.053	

D1059	S1059	77	fcCfasUf	AfuguAfacAfaGfdAGfdT AdTUdCcdAsu	AS1059	1169	GgdTUaAfcAfusGfsa	dAUdGGdAadTAfcUfc UfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.27	0.7	0.054
D1060	S1060	78	adTgudAdAccdAdAgagd TadTUdCcdAsu	AS1060	1170	adTdGGdAadTadCdTdC uudGdGuudAdCadTsgs a	0.11	0.37	0.66	0.056		
D1061	S1061	79	AfuGfuAfaCfcAfaGfdAd GuAfuUfcdCdAsUf	AS1061	1171	adTdGGfaAfuAfdCdTcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.31	0.77	0.059		
D1062	S1062	80	AfuguAfacAfaGfdAGfdT AdTUdCcdAsu	AS1062	1172	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.27	0.65	0.059		
D1063	S1063	81	adTdGuadAdCccdAdGa gdTdAuudCdCasu	AS1063	1173	dAdTggdAaAadCdTcu dTdGgudTdAcadTsdGs a	0.12	0.44	0.82	0.064		
D1064	S1064	82	AfuGfuAfaCfcAfaGfdGfd TdAUufcdCdAsUf	AS1064	1174	adTdGGfaAfdTAcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.32	0.83	0.064		
D1065	S1065	83	AfuguAfacAfaGfdGfdTA dTudCcdAsu	AS1065	1175	dAUdGGdAadTAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.34	0.72	0.066		
D1066	S1066	84	AfuGfuAfaCfcAfaGfdGfu dAdTUfcdCdAsUf	AS1066	1176	adTdGGfadAdTAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.33	0.72	0.067		
D1067	S1067	85	AfuguAfacAfaGfdGfdTA dTudCcdAsu	AS1067	1177	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.37	0.62	0.070		
D1068	S1068	86	AfuguAfacAfaGfdGfdTA dTudCcdAsu	AS1068	1178	dAUdGGdAAuAfcUfcUfu GfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.33	0.64	0.072		
D1069	S1069	87	aUfGfuafCfccAfGfagUf AfuCfcfasu	AS1069	1179	AfUfggAfaAfuCfUfcUfG fgUfAfaUfcaUfGfsa	0.14	0.43	0.73	0.074		

D1070	S1070	88	AfuGfuAfaCfcAfaGfagu AfuUfcCfasUf	AS1070	1180	aUfgGfaAfuAfcUfcUfug gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.08	0.42	0.94	0.075
D1071	S1071	89	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfaA fcCfaAfgsAf	AS1071	1181	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAf AfAfuCfcCfasUfsc	0.14	0.28	0.83	0.0797
D1072	S1072	90	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGf uuUfcCfasUf	AS1072	1182	aUfgGfaAfuAfcucUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.05	0.26	0.8	0.082
D1073	S1073	91	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGd TdAdTUfcCfasUf	AS1073	1183	aUfgGfadAdTdAdCUfcU fuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.12	0.41	0.73	0.083
D1074	S1074	92	AfUfguAfaCfcAfaGfAfGf auUfcCfasUf	AS1074	1184	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GfuAfcAfcAfcGfsa	0.14	0.44	0.75	0.086
D1075	S1075	93	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1075	1185	aUfgGfdAdAdTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.1	0.41	0.72	0.088
D1076	S1076	94	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu dAdTdTdCCfasUf	AS1076	1186	aUfgdGdAdAdTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.15	0.45	0.86	0.088
D1077	S1077	95	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasu	AS1077	1187	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuG fgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.08	0.46	0.95	0.092
D1078	S1078	96	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1078	1188	dAUdGGdAadTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.09	0.32	0.76	0.093
D1079	S1079	97	AfuguAfaCfcAfaGfaGfdTa dTudCcdAsu	AS1079	1189	dAudGgdAadTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.14	0.38	0.76	0.095
D1080	S1080	98	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGf uAfuucCfasUf	AS1080	1190	aUfgGfAfAfuAfcucUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.05	0.42	0.86	0.099
D1081	S1081	99	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfdCdCdAsdT	AS1081	1191	dAdTdGdGaAfuAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.17	0.47	0.9	0.105
D1082	S1082	100	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuU	AS1082	1192	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.12	0.44	0.83	0.106

D1083	S1083	101	fcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1083	1193	dGGfudTAfcAfusgsa	0.11	0.34	0.74	0.109
D1084	S1084	102	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uauUfcCfasUf	AS1084	1194	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuG fguuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.93	0.117	
D1085	S1085	103	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uauUfcCfasUf	AS1085	1195	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuG fgUfuacAfusGfsa	0.07	0.42	0.78	0.120	
D1086	S1086	104	aUfguAfaCfcAfaGfaGfuAfu UfcCfasUf	AS1086	1196	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GtuuAfcAfusGfsa	0.17	0.45	0.83	0.1197	
D1087	S1087	105	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fAfuUfcCfasUf	AS1087	1197	AfuGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.3	0.7	0.120	
D1088	S1088	106	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1088	1198	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusgsa	0.11	0.46	0.8	0.120	
D1089	S1089	107	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fAfuUfcCfasUf	AS1089	1199	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf UfuAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.85	0.122	
D1090	S1090	108	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1090	1200	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuG fgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.85	0.125	
D1091	S1091	109	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfu dTudCcodAsu	AS1091	1201	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.38	0.77	0.125	
D1092	S1092	110	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuUfcCfasUf	AS1092	1202	AfuGfaAfuAfcucUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.31	0.93	0.126	
D1093	S1093	111	auGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1093	1203	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf UfuAfcAfusGfsa	0.06	0.33	0.9	0.135	
D1094	S1094	112	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fAfuUfccasUf	AS1094	1204	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.39	0.85	0.142	

D1095	S1095	113	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1095	1205	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg UfuAfcAfusGfsa	0.09	0.39	0.76	0.146
D1096	S1096	114	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fAfuucCfasUf	AS1096	1206	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg gUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.85	0.147
D1097	S1097	115	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuucCfasUf	AS1097	1207	aUfgGfaAfuAfcuUfuG fgUfuacAfusGfsa	0.12	0.47	0.87	0.147
D1098	S1098	116	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfUfUfccasUf	AS1098	1208	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg gUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.85	0.151
D1099	S1099	117	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1099	1209	dAUdGgaAdTAdCUfc UfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.41	0.85	0.152
D1100	S1100	118	AfugAfacAfaGfaGfuAf uUfcCfasUf	AS1100	1210	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg gUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.48	0.72	0.152
D1101	S1101	119	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfccasUf	AS1101	1211	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg gUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.94	0.158
D1102	S1102	120	AfuGfuAfaccaagaguAfuU fcCfasUf	AS1102	1212	aUfgGfaAfuAfdCuCfdTu GfdGuUfacAfusGfsa	0.21	0.45	0.89	0.162
D1103	S1103	121	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1103	1213	aUfgGfaAfuAfcuUfugg UfUfAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.95	0.163
D1104	S1104	122	AfuGfuAfacAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1104	1214	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg GfUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.36	0.92	0.163
D1105	S1105	123	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuucCfasUf	AS1105	1215	aUfgGfaAfuAfcuUfuG fgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.84	0.167
D1106	S1106	124	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1106	1216	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg UfUfAfcAfusGfsa	0.09	0.43	0.91	0.170
D1107	S1107	125	AfuGfuAfacAfaGfaGfu	AS1107	1217	aUfgGfaAfuAfcuUfuGfg	0.09	0.46	1	0.171

D1120	S1120	138	AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1120	1230	gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.63	0.72
D1121	S1121	139	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuA fuUfcCfasUf	AS1121	1231	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.91
D1122	S1122	140	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuUfccasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfccasUf	AS1122	1232	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.54	0.95
D1123	S1123	141	auGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	auGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1123	1233	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf guuAfcAfcAfusGfsa	0.13	0.61	0.97
D1124	S1124	142	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1124	1234	aUfgGfaauAfcUfcUfuGf UfuAfcAfusGfsa	0.14	0.56	0.94
D1125	S1125	143	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuA fuUfcCfasUf	AS1125	1235	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.74	0.95
D1126	S1126	144	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuucCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuucCfasUf	AS1126	1236	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.69	0.91
D1127	S1127	145	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1127	1237	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf guuAfcAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.96
D1128	S1128	146	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1128	1238	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.62	0.85
D1129	S1129	147	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1129	1239	aUfggaAfuAfcUfcUfuGf UfuAfcAfusGfsa	0.23	0.76	0.98
D1130	S1130	148	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuA fuUfcCfasUf	AS1130	1240	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.64	0.9
D1131	S1131	149	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1131	1241	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fguuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	1.01

D1132	S1132	150	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1132	1242	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.17	0.58	0.87	
D1133	S1133	151	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfaIsUf	AS1133	1243	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.33	0.89	1.05	
D1134	S1134	152	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1134	1244	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.64	0.96	
D1135	S1135	153	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1135	1245	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.12	0.53	0.96	
D1136	S1136	154	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1136	1246	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.16	0.58	0.98	
D1137	S1137	155	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1137	1247	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.16	0.6	0.91	
D1138	S1138	156	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1138	1248	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsAf	0.1	0.54	0.91	
D1139	S1139	157	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1139	1249	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.24	0.68	0.98	
D1140	S1140	158	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1140	1250	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.13	0.75	0.9	
D1141	S1141	159	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1141	1251	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.15	0.52	1.05	
D1142	S1142	160	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1142	1252	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.66	0.89	
D1143	S1143	161	auGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1143	1253	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuIsGfsa	0.12	0.51	0.89	
D1144	S1144	162	AfuGfuAfaCfaAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1144	1254	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.25	0.71	0.95	

D1145	S1145	163	AfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcaaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1145	1255	fgUfuAfoausGfsa	0.17	0.74	0.98	
D1146	S1146	164	AfugAfaCfaAfaGfaGfuA fuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfaAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1146	1256	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.11	0.51	0.86	
D1147	S1147	165	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1147	1257	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fgUfuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.1	0.52	0.83	
D1148	S1148	166	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1148	1258	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GfUfuAfoausGfsa	0.14	0.63	0.98	
D1149	S1149	167	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1149	1259	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fguuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.13	0.58	0.88	
D1150	S1150	168	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu fuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfuA fuUfcCfasUf	AS1150	1260	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.15	0.62	0.94	
D1151	S1151	169	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1151	1261	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.18	0.73	0.94	
D1152	S1152	170	auGfUfAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	auGfUfAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1152	1262	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuacAfUfsGfsa	0.13	0.53	0.97	
D1153	S1153	171	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu uAfuUfcCfasUf	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGf uAfuUfcCfasUf	AS1153	1263	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf fguuAfcAfcAfcAfcGfsa	0.13	0.53	0.98	
D1154	S1154	172	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	AS1154	1264	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAf aAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.5	0.78	
D1155	S1155	173	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa fAfcCfaAfgsAf	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa fAfcCfaAfgsAf	AS1155	1265	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAf AfAfuCfcCfasUfsc	0.13	0.62	0.89	
D1156	S1156	174	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	AS1156	1266	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfA fAfuCfcCfasUfsc	0.12	0.65	0.85	

D1157	S11157	175	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfa fAfcCfaAfgsAf	AS11157	1267	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAfa AfuCfcCfasUfsc	0.11	0.54	0.85	
D1158	S11158	176	UfgGfgAfuuaCfaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	AS11158	1268	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAf AfaUfcCfcCfasUfsc	0.13	0.53	0.8	
D1159	S11159	177	UfgGfgAfuUfuUfcAfuGfuA fAfccAfaAfgsAf	AS11159	1269	uCfuUfgGfuuaAfcAfuGaa fauCfcCfcasUfsc	0.59	0.89	0.81	
D1160	S11160	178	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfa fAfcCfaAfgsAf	AS11160	1270	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAf AfaUfcCfcasUfsc	0.16	0.72	0.9	
D1161	S11161	179	UfgGfgAfuUfucaUfgUfa AfcCfaAfgsAf	AS11161	1271	uCfuUfgGfuUfacaUfgAf aAfuCfcCfasUfsc	0.27	0.69	0.86	
D1162	S11162	180	AfuGfuAfaCfcaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS11162	1272	aUfgGfaAfuacUfcUfUfgf gUfuAfcAfusGfisa	0.12	0.6	0.95	
D1163	S11163	181	AfuGfuAfaCfcaGfaGfuA fUfUfcCfasUf	AS11163	1273	aUfgGfaauAfcUfcUfuGf GfuUfuAfcAfusGfisa	0.05	0.56	1.02	
D1164	S11164	182	AfuGfuAfaCfcaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS11164	1274	aUfgGfaAfuacUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfisa	0.13	0.55	1	
D1165	S11165	183	AfuGfuAfaCfcaGfaGfuA fUfUfcCfasUf	AS11165	1275	aUfgGfaauAfcUfcUfUfgf gUfuAfcAfusGfisa	0.09	0.6	0.97	
D1166	S11166	184	AfuGfuAfaCfcaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS11166	1276	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugg UfuAfcAfusGfisa	0.15	0.59	0.91	
D1167	S11167	185	AfuGfuAfaCfcaGfaGfuA fUfUfcCfasUf	AS11167	1277	aUfgGfaauAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfisa	0.11	0.59	1	
D1168	S11168	186	AfuGfuAfaCfcaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS11168	1278	aUfgGfaAfuAfcUfcUfug gUfuAfcAfusGfisa	0.13	0.57	0.94	
D1169	S11169	187	auGfuAfaCfcaGfaGfuA	AS11169	1279	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfg	0.08	0.5	0.9	

D1170	S1170	188	fUfCfCfAsUf	AfuGfuaAfaCfAfaGfaGfuA fUfCfCfAsUf	AS1170	1280	UfuAfcAfuUfsGfsa	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.06	0.53	0.91
D1171	S1171	189	auGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCfCfAsUf	AS1171	1281	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.07	0.56	0.89		
D1172	S1172	190	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA uAfuucCfAsUf	AS1172	1282	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfg gUfuAfcAfuUfsGfsa	0.13	0.59	0.98		
D1173	S1173	191	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA AfuUfCfCfAsUf	AS1173	1283	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfg gUfuAfcAfuUfsGfsa	0.2	0.65	1.03		
D1174	S1174	192	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA fUfCfCfAsUf	AS1174	1284	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.07	0.51	0.95		
D1175	S1175	193	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCfCfAsUf	AS1175	1285	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.2	0.53	0.76		
D1176	S1176	194	auGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCfAfsUf	AS1176	1286	augGfaAfuAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.74	0.98	0.81		
D1177	S1177	195	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA AfuucCfAfsUf	AS1177	1287	augGfaAfuAfcUfcUfuGfg gUfuAfcAfuUfsGfsa	0.43	0.64	0.88		
D1178	S1178	196	auguaaccAfaGfaGfuAfu UfCfCfAsUf	AS1178	1288	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfg gUfuAfcAfuUfsGfsa	0.17	0.49	0.81		
D1179	S1179	197	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCfCfAsUf	AS1179	1289	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.22	0.65	0.73		
D1180	S1180	198	AfuGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCfAfsUf	AS1180	1290	augGfaAfuAfcUfcUfuGfg UfuAfcAfuUfsGfsa	0.6	1.09	0.8		
D1181	S1181	199	auGfuAfaCfAfaGfaGfuA fuUfCcasu	AS1181	1291	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfg gUfuAfcAfuUfsGfsa	0.3	0.78	0.78		

D1182	S1182	200	auguaaccaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1182	1292	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.35	0.73	0.84
D1183	S1183	201	AfuGfuAfcAfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1183	1293	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfGf fUfuAfcAfcAfcGfsa	0.19	0.6	0.94
D1184	S1184	202	AfuGfuAfcAfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1184	1294	augGfaAfuAfcUfcUfuGfGf UfuAfcAfcAfcGfsa	0.61	1.08	0.8
D1185	S1185	203	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1185	1295	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.16	0.52	0.72
D1186	S1186	204	auguaaccaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1186	1296	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.2	0.53	0.74
D1187	S1187	205	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1187	1297	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.34	0.66	0.85
D1188	S1188	206	AfuGfuAfcAfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1188	1298	augGfaAfuAfcUfcUfuGfGf UfuAfcAfcAfcGfsa	0.61	0.98	1.02
D1189	S1189	207	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1189	1299	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.3	0.73	0.85
D1190	S1190	208	auguaaccaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1190	1300	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.28	0.69	0.78
D1191	S1191	209	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1191	1301	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGf GudTadCadTsgsa	0.33	0.88	0.64
D1192	S1192	210	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1192	1302	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfGf gUfuAfcAfcAfcGfsa	0.31	0.64	0.83
D1193	S1193	211	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1193	1303	augGfaAfuAfcUfcUfuGfGf GfUfuAfcAfcAfcGfsa	0.64	0.82	0.92
D1194	S1194	212	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1194	1304	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGf	0.21	0.62	0.77

D1195	S1195	213	auuccasu	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1195	1305	gUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.95	
D1196	S1196	214	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1196	1306	aUfggaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.71	0.65		
D1197	S1197	215	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1197	1307	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.64	0.82	0.93		
D1198	S1198	216	auguAfaCfcAfaGfaGfuAf uUfccasu	AS1198	1308	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.65	0.72		
D1199	S1199	217	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1199	1309	aUfggaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.52	0.64		
D1200	S1200	218	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1200	1310	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.48	0.74	0.92		
D1201	S1201	219	auguAfaCfcAfaGfaGfuAf uUfcCfasu	AS1201	1311	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.71	0.77		
D1202	S1202	220	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1202	1312	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.43	0.69	0.85		
D1203	S1203	221	auguaaCfcAfaGfaGfuAf UfcCfasUf	AS1203	1313	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.76		
D1204	S1204	222	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1204	1314	adTdGGfaAfuAdCUfcU fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.56	0.89		
D1205	S1205	223	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfd TdAdTdTcCfasUf	AS1205	1315	aUfgGfdAdAdTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.57	0.9		
D1206	S1206	224	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1206	1316	adTdGdGdAAfuAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.29	0.73	0.89		

D1195	S1195	213	auuccasu	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1195	1305	gUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.95	
D1196	S1196	214	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1196	1306	aUfggaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.71	0.65		
D1197	S1197	215	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1197	1307	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.64	0.82	0.93		
D1198	S1198	216	auguAfaCfcAfaGfaGfuAf uUfccasu	AS1198	1308	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.65	0.72		
D1199	S1199	217	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1199	1309	aUfggaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.52	0.64		
D1200	S1200	218	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguA fuUfcCfasUf	AS1200	1310	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.48	0.74	0.92		
D1201	S1201	219	auguAfaCfcAfaGfaGfuAf uUfcCfasu	AS1201	1311	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.71	0.77		
D1202	S1202	220	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1202	1312	augGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.43	0.69	0.85		
D1203	S1203	221	auguaaCfcAfaGfaGfuAf UfcCfasUf	AS1203	1313	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.76		
D1204	S1204	222	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1204	1314	adTdGGfaAfuAdCUfcU fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.56	0.89		
D1205	S1205	223	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfd TdAdTdTcCfasUf	AS1205	1315	aUfgGfdAdAdTdAcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.57	0.9		
D1206	S1206	224	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1206	1316	adTdGdGdAAfuAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.29	0.73	0.89		

D1207	S1207	225	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1207	1317	adTdGGfaAfuAfdCdTcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.56	0.78	
D1208	S1208	226	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1208	1318	aUfdGdGdAdAuAfcUfcU fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.22	0.67	0.89	
D1209	S1209	227	AfuguAfacAfaGfaGfuAf uUfcCfasUf	AS1209	1319	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf GfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.55	0.78	
D1210	S1210	228	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1210	1320	aUfgdGdAdAdTAdUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.5	0.84	
D1211	S1211	229	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1211	1321	aUfgGfadAdTAdCufcU fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.59	0.72	
D1212	S1212	230	auguaaccaaGfaGfuAfuUf cCfasUf	AS1212	1322	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugd GudTadCadTsgsa	0.21	0.74	0.77	
D1213	S1213	231	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuTdcCdCdasUf	AS1213	1323	adTdGdGdAAfuAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.53	0.91	
D1214	S1214	232	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUf aUfuCfcAfsu	AS1214	1324	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGf gUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.71	0.87	
D1215	S1215	233	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfdTdCdCdCasUf	AS1215	1325	aUfdGdGdAdAuAfcUfcU fuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.67	0.97	
D1216	S1216	234	AfuGfuAfaccaagaguAfuU fcCfasUf	AS1216	1326	aUfgGfaAfuacuuggUf uAfcAfusgsa	0.36	0.87	1.07	
D1217	S1217	235	AfuGfuAfaccaagaguAfuU fcCfasUf	AS1217	1327	aUfgGfaAfuAfcUfcUfu GfGfuAfcAfusgsa	0.37	0.73	1.03	
D1218	S1218	236	AfUfguAfaCfcAfaGfaGfu auUfcCfasUf	AS1218	1328	aUfGfgaAfuUfcUfcUfuGf GfuAfcAfusGfsa	0.23	0.42	0.84	
D1219	S1219	237	AfuGfuAfaccaagaguAfuU	AS1219	1329	aUfgGfaAfuAfcUfcUfug	0.43	0.71	1.03	

D1220	S1220	238	fcCfasUf	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1220	1330	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.37	0.63	0.99	
D1221	S1221	239	fcCfasUf	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1221	1331	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.29	0.84	0.88	
D1222	S1222	240	fcCfasUf	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1222	1332	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.31	0.8	0.99	
D1223	S1223	241	UfUfcCfasUf	auGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1223	1333	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.09	0.52	0.82	
D1224	S1224	242	fcCfasUf	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1224	1334	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.22	0.79	1	
D1225	S1225	243	uCfcasUf	auGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1225	1335	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.31	0.76	0.84	
D1226	S1226	244	fcCfasUf	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1226	1336	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.26	0.64	0.87	
D1227	S1227	245	ccAfsu	augUfaacCfaagAfguaUfuUfcCfasUf	AS1227	1337	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.33	0.79	0.81	
D1228	S1228	246	AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1228	1338	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.464	0.932	0.978	
D1229	S1229	247	AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1229	1339	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.453	1.047	1.178	
D1230	S1230	248	AfuUfcCfasUf	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1230	1340	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.831	0.967	1.151	
D1231	S1231	249	AfuUfcCfasUf	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1231	1341	GfuuAfcAfusgsa	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuUfacAfusgsa	0.09	0.5	1.07	

D1232	S1232	250	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1232	1342	AfuGfgAfaUfaUfcUfugGfuAfcAfcAfcGfsa	0.11	0.54	1.1	
D1233	S1233	251	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1233	1343	AfuGfgaAfaUfaUfcUfugGfuAfcAfcAfcGfsa	0.19	0.61	0.74	
D1234	S1234	252	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1234	1344	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAfc	0.22	0.61	0.98	
D1235	S1235	253	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1235	1345	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAfc	0.27	0.69	0.92	
D1236	S1236	254	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1236	1346	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAfc	0.54	1.08	0.8	
D1237	S1237	255	augUfaAfcAfaAfgAfguaUfuCfcasu	AS1237	1347	AfuGfgAfaUfaAfcCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsa	0.29	0.61	0.79	
D1238	S1238	256	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1238	1348	AfuGfgAfaUfaAfcCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsa	0.31	0.6	0.88	
D1239	S1239	257	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1239	1349	dAUdGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.2	0.67	0.85	
D1240	S1240	258	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1240	1350	dAUdGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.23	0.58	0.68	
D1241	S1241	259	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1241	1351	dAudGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.25	0.65	0.78	
D1242	S1242	260	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1242	1352	dAUdGgdAadTafCfuUfcUfuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.18	0.64	0.84	
D1243	S1243	261	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1243	1353	dAUdGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcAfcGfsa	0.19	0.72	0.87	
D1244	S1244	262	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu	AS1244	1354	dAUdGgdAadTafdCUfc	0.16	0.55	0.8	

D1245	S1245	263	AfuUfcCfasUf	AS1245	1355	UfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.22	0.51	0.9	
D1246	S1246	264	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1246	1356	dAUdGGdAAuAfcUfcUfu GfgUfuAfcAfcGfsa	0.27	0.78	0.66	
D1247	S1247	265	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfu AfuUfcCfasUf	AS1247	1357	dAdTdGdGaAfuAfcUfcUf uGfgUfuAfcAfcGfsa	0.16	0.57	0.97	
D1248	S1248	266	AfacaAfuUfcUfuGfdC UdCudAudAsa	AS1248	1358	dTUdAudAgdAGfcAfaGf aAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.09	0.36	0.0047
D1249	S1249	267	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc fUfcUfaUfasa	AS1249	1359	UfuUfaGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.47	0.005
D1250	S1250	268	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcU fcUfAfUfasAf	AS1250	1360	uUfauGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	0.005
D1251	S1251	269	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc ucUfAfUfasAf	AS1251	1361	uUfauGfAfGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.006
D1252	S1252	270	cAGuGuucuuGcucuAuA AdTdT	AS1252	1362	UuAuAGAGcAAAGAAcA CUGdTdT				0.006
D1253	S1253	271	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcU fCfUfaUfasAf	AS1253	1363	uUfaUfagaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.12	0.43	0.006
D1254	S1254	272	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf cUfcUfaUfasa	AS1254	1364	UfuUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.39	0.006
D1255	S1255	273	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc UfCfUfaUfasa	AS1255	1365	UfuUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.48	0.007
D1256	S1256	274	AfaCfaGfuGfuUfcUfUGf cUfcUfaUfasa	AS1256	1366	UfuUfaGfaGfcaAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.40	0.007

D1257	S1257	275	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1257	1367	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.07	0.12	0.40	0.007
D1258	S1258	276	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1258	1368	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.08	0.13	0.41	0.007
D1259	S1259	277	AfaCfafGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1259	1369	uUfaUfaGfAfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.05	0.11	0.35	0.008
D1260	S1260	278	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1260	1370	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.06	0.12	0.40	0.008
D1261	S1261	279	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1261	1371	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.06	0.13	0.42	0.008
D1262	S1262	280	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1262	1372	uUfaUfaGfAfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.06	0.13	0.37	0.008
D1263	S1263	281	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1263	1373	UuAuAGAGcAAGAAcAcUGdTdT				0.008
D1264	S1264	282	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1264	1374	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.07	0.12	0.50	0.008
D1265	S1265	283	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1265	1375	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.12	0.13	0.48	0.009
D1266	S1266	284	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1266	1376	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.07	0.15	0.51	0.009
D1267	S1267	285	AfacaAfuguUfcUfuGfdCudAudAfa	AS1267	1377	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.06	0.14	0.48	0.0088
D1268	S1268	286	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1268	1378	uUfaUfaGfAfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfusUf	0.05	0.09	0.35	0.009
D1269	S1269	287	cAGuGuucuuGcucuAuA	AS1269	1379	UuAuAGAGcAAGAAcAc				0.009

D1270	S1270	288	AdTdT	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1270	1380	CUGdTdT	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsUfsu	0.07	0.14	0.49	0.009
D1271	S1271	289	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1271	1381	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfUfsUfsu	0.06	0.10	0.36	0.09	0.009	
D1272	S1272	290	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1272	1382	UuAuAGAGcAAGAAcAcCUGdTdT				0.009		
D1273	S1273	291	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1273	1383	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfUfsUfsu	0.06	0.13	0.51	0.009		
D1274	S1274	292	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1274	1384	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsUfsu	0.06	0.12	0.46	0.010		
D1275	S1275	293	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1275	1385	UuAuAGAGcAAGAAcAcCUGdTdT				0.010		
D1276	S1276	294	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1276	1386	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsUfsu	0.06	0.14	0.47	0.010		
D1277	S1277	295	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1277	1387	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsUfsu	0.07	0.15	0.50	0.010		
D1278	S1278	296	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1278	1388	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsUfsu	0.06	0.13	0.43	0.010		
D1279	S1279	297	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1279	1389	UuAuAGAGcAAGAAcAcCUGdTdT				0.010		
D1280	S1280	298	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1280	1390	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfUfsusu	0.06	0.14	0.45	0.010		
D1281	S1281	299	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1281	1391	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfUfsu	0.07	0.18	0.46	0.011		

D1282	S1282	300	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1282	1392	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	0.011
D1283	S1283	301	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1283	1393	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.12	0.45	0.011
D1284	S1284	302	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1284	1394	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.48	0.011
D1285	S1285	303	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1285	1395	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.06	0.11	0.40	0.011
D1286	S1286	304	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1286	1396	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.06	0.16	0.47	0.011
D1287	S1287	305	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1287	1397	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.19	0.46	0.012
D1288	S1288	306	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1288	1398	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.17	0.46	0.012
D1289	S1289	307	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1289	1399	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.31	0.012
D1290	S1290	308	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasa	AS1290	1400	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.06	0.16	0.49	0.013
D1291	S1291	309	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1291	1401	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.06	0.11	0.32	0.013
D1292	S1292	310	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasAf	AS1292	1402	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.06	0.14	0.44	0.013
D1293	S1293	311	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasa	AS1293	1403	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.39	0.013
D1294	S1294	312	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfasa	AS1294	1404	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.41	0.014

D1295	S1295	313	cUfcuaUfasAf	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGf cUfcuaUfasAf	AS1295	1405	fcAfcugUfusUfsu	0.07	0.18	0.47	0.014
D1296	S1296	314	adAdCagdTcGuudCdTu gdCdTcudAdTasa	adAdCagdTcGuudCdTu gdCdTcudAdTasa	AS1296	1406	dTdTaudAdCagadCdAag cAdAcadCdTgudTsdTsu	0.12	0.21	0.68	0.0146
D1297	S1297	315	AfacaGfUfGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AfacaGfUfGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1297	1407	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cacUfGfUfusUfsu	0.06	0.15	0.50	0.016
D1298	S1298	316	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfc cUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfc cUfcUfaUfasAf	AS1298	1408	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf fcacUfGfUfusUfsu	0.08	0.17	0.50	0.016
D1299	S1299	317	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcU fcUfaUfasAf	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcU fcUfaUfasAf	AS1299	1409	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfCfUfgUfususu	0.07	0.16	0.50	0.018
D1300	S1300	318	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc cUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc cUfcUfaUfasAf	AS1300	1410	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.43	0.020
D1301	S1301	319	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1301	1411	uUfaUfaGfaGfcAfaGfa AfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.45	0.021
D1302	S1302	320	AfaCfaGfuguUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuguUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1302	1412	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAf CfAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.49	0.021
D1303	S1303	321	AfaCfaguGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AfaCfaguGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1303	1413	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfCfUfguusUfsu	0.07	0.24	0.51	0.022
D1304	S1304	322	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcU fcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcU fcUfaUfasAf	AS1304	1414	uUfaUfaGfaGfcAfaGfAFA fcAfcUfgUfususu	0.09	0.27	0.47	0.033
D1305	S1305	323	aadCdAgudGdTuccdTdTg cdTdCuadTdAasa	aadCdAgudGdTuccdTdTg cdTdCuadTdAasa	AS1305	1415	udTadTcAgadGdCaadG dAacdAdCugdTdTtsusu	0.19	0.36	0.86	0.045
D1306	S1306	324	AfacaGfuguUfcUfuGfc UdCUdAudAasa	AfacaGfuguUfcUfuGfc UdCUdAudAasa	AS1306	1416	dTUdAUdAGfaGfcAfaGf aAfCfAfcUfGfUfusUfsu	0.08	0.22	0.61	

D1307	S1307	325	AfacaGfuguUfcUfdTGfd CUdCUdAudAsa	AS1307	1417	dTUdAUdAGfaGfcAfaGf aAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.39	0.84
D1308	S1308	326	AfacaGfuguUfcUfuGfdC UdCUdAudAsa	AS1308	1418	dTUdAUdAGdAGfcAfaGf aAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48
D1309	S1309	327	AfacaGfuguUfcUfdTGfd CUdCUdAudAsa	AS1309	1419	dTUdAUdAGdAGfdCAfa GfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.13	0.58
D1310	S1310	328	AfacaAfcuUfcUfdTGfdC UdCUdAudAsa	AS1310	1420	dTUdAUdAGdAGfdCAfa GfaAfcAfcAfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55
D1311	S1311	329	AfaCfaAfcuGfuUfcUfuGfc UfcUfdAdTdAsdA	AS1311	1421	dTdTdAdTtaGfaGfcAfaGf aAfcAfcAfgUfusUfsu	0.10	0.30	0.66
D1312	S1312	330	AfacaGfuguUfcUfuGfdC UdCUdAudAsa	AS1312	1422	dTUdAUdAGdAGfcAfaGf aAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48
D1313	S1313	331	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1313	1423	uUfaUfaGfaGfcAfaGfAfa fcAfcUfguusUfsu	0.14	0.38	0.74
D1314	S1314	332	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1314	1424	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.19	0.54
D1315	S1315	333	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1315	1425	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55
D1316	S1316	334	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc UfcUfauasAf	AS1316	1426	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaA fcAfcUfgUfususu	0.07	0.16	0.53
D1317	S1317	335	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcU fcUfaUfasAf	AS1317	1427	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfususu	0.07	0.16	0.55
D1318	S1318	336	AfaCfaGfuguUfcUfuGfc UfcUfaUfasAf	AS1318	1428	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf CfaCfaUfguusUfsu	0.10	0.32	0.61
D1319	S1319	337	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfc	AS1319	1429	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf	0.08	0.16	0.53

D1320	S1320	338	UfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1320	1430	cAfcUfgUfususu	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfususu	0.08	0.16	0.61
D1321	S1321	339	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1321	1431	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.58	
D1322	S1322	340	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1322	1432	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.49	0.84	
D1323	S1323	341	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1323	1433	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.20	0.62	
D1324	S1324	342	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1324	1434	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.25	0.78	
D1325	S1325	343	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1325	1435	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.18	0.80	
D1326	S1326	344	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1326	1436	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.66	
D1327	S1327	345	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1327	1437	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.31	0.70	
D1328	S1328	346	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1328	1438	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1329	S1329	347	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1329	1439	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.08	0.19	0.71	
D1330	S1330	348	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1330	1440	uuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.76	
D1331	S1331	349	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1331	1441	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.65	

D1332	S1332	350	AfAtCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1332	1442	uUfaUfaAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguuUfsu	0.07	0.17	0.53	
D1333	S1333	351	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1333	1443	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.08	0.25	0.73	
D1334	S1334	352	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1334	1444	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfCfUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.54	
D1335	S1335	353	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1335	1445	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfgUfususu	0.14	0.38	0.57	
D1336	S1336	354	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1336	1446	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.50	0.96	
D1337	S1337	355	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1337	1447	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.54	
D1338	S1338	356	AfAtCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1338	1448	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguuUfsu	0.08	0.20	0.69	
D1339	S1339	357	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1339	1449	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55	
D1340	S1340	358	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1340	1450	uUfaUfaAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.57	
D1341	S1341	359	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1341	1451	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.22	0.63	
D1342	S1342	360	AfAtCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1342	1452	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfguuUfsu	0.21	0.56	0.86	
D1343	S1343	361	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1343	1453	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfGfUfusUfsu	0.14	0.37	0.73	
D1344	S1344	362	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1344	1454	uUfaUfaGfaGfcaaGfAfAf	0.08	0.20	0.66	

D1345	S1345	363	UfcUfaUfasAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1345	1455	cAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.34	0.73	
D1346	S1346	364	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1346	1456	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.16	0.42	0.90		
D1347	S1347	365	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1347	1457	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.17	0.43	0.85		
D1348	S1348	366	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1348	1458	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.08	0.21	0.58		
D1349	S1349	367	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1349	1459	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.39	0.88		
D1350	S1350	368	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1350	1460	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.52		
D1351	S1351	369	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1351	1461	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.08	0.21	0.58		
D1352	S1352	370	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1352	1462	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.49	0.84		
D1353	S1353	371	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1353	1463	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.25	0.68		
D1354	S1354	372	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1354	1464	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.52		
D1355	S1355	373	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1355	1465	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.26	0.63		
D1356	S1356	374	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1356	1466	uUfaUfaGfaGfaAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.33	0.79		

D1357	S1357	375	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf cUfcUfaUfasAf	AS1357	1467	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.09	0.19	0.51
D1358	S1358	376	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf UfcUfaUfasAf	AS1358	1468	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.22	0.48	0.71
D1359	S1359	377	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf cUfcUfaUfasAf	AS1359	1469	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf AfcUfgUfusUfsUf	0.10	0.17	0.61
D1360	S1360	378	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf UfcUfaUfasAf	AS1360	1470	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf AfcUfgUfusUfsUf	0.14	0.40	0.87
D1361	S1361	379	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf cUfcuaUfasAf	AS1361	1471	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.07	0.14	0.52
D1362	S1362	380	aaCfaGfuGfuUfcUfuGf UfcUfaUfasAf	AS1362	1472	uUfaUfaGfagcAfaGfaAf AfcUfgUfusUfsUf	0.10	0.28	0.81
D1363	S1363	381	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf fcUfaUfasAf	AS1363	1473	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.06	0.16	0.68
D1364	S1364	382	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf fcUfaUfasAf	AS1364	1474	uuUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.09	0.26	0.67
D1365	S1365	383	aacaguguucuuugcuuaa sa	AS1365	1475	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.20	0.59	0.95
D1366	S1366	384	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf fUfcUfaUfasAf	AS1366	1476	uUfaUfaGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.06	0.13	0.53
D1367	S1367	385	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf fUfcUfaUfasAf	AS1367	1477	uUfaUfaGfagcAfaGfaAf AfcUfgUfusUfsUf	0.08	0.16	0.53
D1368	S1368	386	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf fcUfaUfasAf	AS1368	1478	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAf CfaCfcUfgUfusUfsUf	0.07	0.15	0.54
D1369	S1369	387	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGf cUfcUfaUfasAf	AS1369	1479	uuUfaGfaGfcAfaGfaAf	0.23	0.56	0.89

D1370	S1370	388	fcUfaUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1370	1480	cAfcUfgUfusUfsu	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.55
D1371	S1371	389	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1371	1481	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.58	
D1372	S1372	390	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1372	1482	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.56	
D1373	S1373	391	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1373	1483	uuaUfaGfaGfcAfaGfAfAf cAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.51	0.89	
D1374	S1374	392	AfacaGfuguUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfacaGfuguUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1374	1484	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.64	
D1375	S1375	393	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1375	1485	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.40	0.94	
D1376	S1376	394	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1376	1486	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.40	0.96	
D1377	S1377	395	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1377	1487	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.64	
D1378	S1378	396	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1378	1488	uuaUfaGfaGfcAfaGfAfAf cAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.50	0.97	
D1379	S1379	397	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1379	1489	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.24	0.79	
D1380	S1380	398	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1380	1490	uUfaUfAfGfagcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.58	
D1381	S1381	399	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfUfAfsAf	AS1381	1491	uuaUfaGfaGfcAfaGfAfAf cAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.34	0.96	

D1382	S1382	400	AfaCfaGfuguUfUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1382	1492	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfCfAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.18	0.69
D1383	S1383	401	AfaCfaGfuGfuUfcUuuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1383	1493	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.38	0.85
D1384	S1384	402	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1384	1494	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.07	0.16	0.54
D1385	S1385	403	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1385	1495	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.75
D1386	S1386	404	aacaguguucUfuGfcUcUaUdAsa	AS1386	1496	uUfdAUdAGfaGfcAfaGfaadCadCudGdTtsusu	0.25	0.56	0.90
D1387	S1387	405	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1387	1497	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.70
D1388	S1388	406	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1388	1498	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.60
D1389	S1389	407	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1389	1499	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.62
D1390	S1390	408	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1390	1500	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.27	0.76
D1391	S1391	409	aacaguguucdTudGcdTcdTadTasa	AS1391	1501	uUfdAUdAGfaGfcAfaGfaadCadCudGudTtsusu	0.18	0.36	0.81
D1392	S1392	410	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1392	1502	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.55
D1393	S1393	411	AfaCfaGfuguUfUfuGfcUfCfUfaUfasAf	AS1393	1503	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.57
D1394	S1394	412	AfaCfaGfuGfuUfcUuuGfcU	AS1394	1504	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.26	0.68	1.06

D1395	S1395	413	fcUfAfUfasAf	AS1395	1505	cAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.18	0.58
			AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUcUfaUfAsAf			uuuUfaGfAfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsu			
D1396	S1396	414	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfAsAf	AS1396	1506	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAf cAfcUfgUfusUfsUf	0.09	0.27	0.73
D1397	S1397	415	AfaCfaAfUgfuUfcUfuGfc dAdCdTdAUfasAf	AS1397	1507	uUfadTdAdGdAGfcAfaG faGfcAfcAfgUfusUfsu	0.20	0.51	0.73
D1398	S1398	416	AfacaGfugUfcuuGfcuc UfauasAf	AS1398	1508	uUfAfUfaGfAfGfcAfaGf aAfCfAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.34	0.86
D1399	S1399	417	dAacadGugudTcuudGcu cdTauasda	AS1399	1509	udTdAdTdAdGdAdGcdAd AdGadAdCdAccdTdGdTU sdTsu	0.24	0.42	0.82
D1400	S1400	418	AfaCfaAfUgfuUfcUfuGfd CdAdCdTaUfasAf	AS1400	1510	uUfaUfdAdGdAdGcAfaG faGfcAfcAfgUfusUfsu	0.49	0.85	0.78
D1401	S1401	419	AfaCfaAfUgfuUfcUfuGfd CdAdCUfaUfasAf	AS1401	1511	uUfaUfadGdAdGdCAfa GfaGfcAfcAfgUfusUfsu	0.67	0.83	0.85
D1402	S1402	420	aaCfAfguGfUfucUfUfgcU fCfuaUfAfsa	AS1402	1512	uUfaUfAfgaGfCfaaGfAfa cAfCfugUfUfsusu	0.18	0.47	0.80
D1403	S1403	421	AfaCfaAfUgfuUfcUfuGfc dAdCUfadTdAsAf	AS1403	1513	udTdAUfadGdAGfcAfaG faGfcAfcAfgUfusUfsu	0.73	0.89	0.77
D1404	S1404	422	aacAgugUucuUgcuCuau Asa	AS1404	1514	uUaUAgAGCaAGaACA CuGUUususu	0.12	0.39	0.79
D1405	S1405	423	AacaGuguUcuUgcuUa uasA	AS1405	1515	uUaUJaGAGcAAGaACA cuGUusUusu	0.12	0.37	0.77
D1406	S1406	424	AfaCfaAfUgfuUfcUfuGfd	AS1406	1516	udTdAUfaGfadGdCAfaG	0.59	0.93	0.89

D1407	S1407	425	C AFC U f a d T d A s A f	AS1407	1517	f a G f c A f c A f g U f u s U f s u	0.09	0.16	0.55
			a A C a g U G u w C U u g C U c u A U a s a			U U a u A G a g C A a g A A c a C U g u U s U s u			
D1408	S1408	426	A f a C f a A f u G f u U f c U f u G f c A f c d T d A d T d A s A f	AS1408	1518	u d T d A d T d A G f a G f c A f a G f a A f c A f c A f g U f u s U f s u	0.22	0.64	0.86
D1409	S1409	427	a a C a g u G U u c U U g c U C u a U A s a	AS1409	1519	u U a U A g a G C a a G A a c A C u g U U s u s u	0.13	0.31	0.76
D1410	S1410	428	A f a C f a A f u G f u U f c U f u G f c A f d C d T d A d T d A s A f	AS1410	1520	u d T d A d T d A d G a G f c A f a G f a G f c A f c A f g U f u s U f s u	0.77	0.94	0.93
D1411	S1411	429	a a c A f g u G f u c u U f g c u C f u a u A f s a	AS1411	1521	u U f a U f a f g A f G f c A f a G f a f a C f a f C f u G f U f u s u s u	0.23	0.53	1.04
D1412	S1412	430	a a c d A g u g d T u c u d T g c u d C u a u d A s a	AS1412	1522	u d T a d T d A g d A d G d C a d A d G d A a d C d A d C u d G d T d T s u s u	0.30	0.64	0.90
D1413	S1413	431	A f a C f a G f u G f u U f c U f u G f c U f c U f a U f a s a	AS1413	1523	U f U f a U f a G f a G f c A f a G f a A f c A f c U f g U f u s U f s u	0.09	0.19	0.63
D1414	S1414	432	A f a C f a G f u G f u U f c U f u G f c U f c U f a U f a s a	AS1414	1524	U f U f a U f a G f a G f c A f a G f a a c A f c U f g U f u s U f s u	0.11	0.28	0.66
D1415	S1415	433	A f a C f a G f u G f u U f c U f u G f c f U f c U f a U f a s a	AS1415	1525	U f U f a U f a G f a g c A f a G f a A f c A f c U f g U f u s U f s u	0.06	0.13	0.53
D1416	S1416	434	a a c a g u g u c u u g c u c u a u a s a	AS1416	1526	U f U f a U f a f a G f a f G f c A f a f G f a f a f c f a f c f u f g f u f u s u s u	0.20	0.53	0.99
D1417	S1417	435	A f a C f a G f u G f u U f c U f u G f c U f c U f a U f a s a	AS1417	1527	U f U f a u a G f a G f c A f a G f a A f c A f c U f g U f u s U f s u	0.07	0.17	0.53

D1418	S1418	436	aAfCfagUfGfuuCfUfugCfUfcuAfUfasa	AS1418	1528	UfUfauAfGfagCfAfagAfAfcAfUfgUfUfsU	0.08	0.20	0.70	
D1419	S1419	437	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1419	1529	uUfaUfaGfaGfcAfAfaGfaAfcaAfcugUfUfsUf	0.08	0.20	0.70	
D1420	S1420	438	GfaCfuUfcUfcCfUfcAfGugGfaCfcUfL96	AS1420	1530	aGfgUfcCfAfCfuGfgagGfaaGfaAfgUfcsCfsc				
D1421	S1421	439	GfaCfuUfcUfcCfUfcAfGufGfGfaCfcUfL96	AS1421	1531	aGfgUfccaCfuGfgagGfaGfaAfgUfcsCfsc				
D1422	S1422	440	AfcUfuCfuCfcUfcCfAfGuggAfcCfuGfL96	AS1422	1532	cAfgGfuCfCfAfCfUfggaGfagAfaGfusCfsc				
D1423	S1423	441	AfcUfuCfuCfcUfcCfAfGufGfAfcCfuGfL96	AS1423	1533	cAfgGfuccaAfcUfggaGfgAfaGfusCfsc				
D1424	S1424	442	CfuUfcUfcCfuCfAfUfggaCfcUfgAfl96	AS1424	1534	uCfaGfgUfCfCfAfCfuggAfgGfaGfaAfgsUfsc				
D1425	S1425	443	CfuUfcUfcCfuCfAfUfgGfAfcCfUfgAfl96	AS1425	1535	uCfaGfgucCfAfCfuggAfgGfaGfaAfgsUfsc				
D1426	S1426	444	UfuCfuCfcUfcCfAfGfugacCfuGfaAfl96	AS1426	1536	uUfcAfgGfUfCfAfCfugGfaaGfaAfgAfasGfsu				
D1427	S1427	445	UfuCfuCfcUfcCfAfGfugAfCfCfuGfaAfl96	AS1427	1537	uUfcAfgguCfAfCfugGfaGfAfgAfasGfsu				
D1428	S1428	446	UfcUfcCfuCfcAfGfUfgaccUfgAfaGfL96	AS1428	1538	cUfuCfaGfGfUfcCfacuGfagAfgGfaGfasAfsG				
D1429	S1429	447	UfcUfcCfuCfcAfGfUfgaCfCfUfgAfaGfL96	AS1429	1539	cUfuCfaggUfcCfacuGfagAfgGfaGfasAfsG				
D1430	S1430	448	CfuCfcUfcCfAfGfUfgAf	AS1430	1540	cCfuUfcAfgGfUfcacUf				

D1431	S1431	449	ccuGfaAfgGfL96	CfuCfcUfcCfaGfuGfGfAf cCfUfGfaAfgGfL96	AS1431	1541	gGfaGfgAfgsAfsa	cCfuUfcagGfuCfcacUfg GfaGfgAfgsAfsa					
D1432	S1432	450	UfcCfuCfcAfgUfGfGfaCf cugAfaGfgAfl96	UfcCfuCfcAfgUfGfGfaCf cUfGfaAfgAfl96	AS1432	1542	uCfcUfuCfAfGfgUfccAcf uGfgAfgGfasGfsa	uCfcUfuCfAfGfgUfccAcf uGfgAfgGfasGfsa					
D1433	S1433	451	UfcCfuCfcAfgUfGfGfaCf cUfGfaAfgAfl96	UfcCfuCfcAfgUfGfGfaCf cUfGfaAfgAfl96	AS1433	1543	uCfcUfucaGfgUfccAcfu GfgAfgGfasGfsa	uCfcUfucaGfgUfccAcfu GfgAfgGfasGfsa					
D1434	S1434	452	CfcUfcCfaGfuGfGfAfcCf ugaAfgGfaCfl96	CfcUfcCfaGfuGfGfAfcCf ugaAfgGfaCfl96	AS1434	1544	gUfcCfuUfcAfGfgUfccAf cUfgGfaGfsgAfsa	gUfcCfuUfcAfGfgUfccAf cUfgGfaGfsgAfsa					
D1435	S1435	453	CfcUfcCfaGfuGfGfAfcCf uGfAfaGfaCfl96	CfcUfcCfaGfuGfGfAfcCf uGfAfaGfaCfl96	AS1435	1545	gUfcCfuucAfgGfuuccAfcU fgGfaGfsgAfsa	gUfcCfuucAfgGfuuccAfcU fgGfaGfsgAfsa					
D1436	S1436	454	CfuCfcAfgUfgGfAfcCfuUfg aaGfgAfcGfL96	CfuCfcAfgUfgGfAfcCfuUfg aaGfgAfcGfL96	AS1436	1546	cGfuCfcUfuCfaGfgucCf aCfuGfgAfgsGfsa	cGfuCfcUfuCfaGfgucCf aCfuGfgAfgsGfsa					
D1437	S1437	455	CfuCfcAfgUfgGfAfcCfuUfg AfAfgAfcGfL96	CfuCfcAfgUfgGfAfcCfuUfg AfAfgAfcGfL96	AS1437	1547	cGfuCfcuuCfaGfgucCfa CfuGfgAfgsGfsa	cGfuCfcuuCfaGfgucCfa CfuGfgAfgsGfsa					
D1438	S1438	456	UfcCfaGfuGfgAfcCfuGf aagGfaCfgAfl96	UfcCfaGfuGfgAfcCfuGf aagGfaCfgAfl96	AS1438	1548	uCfgUfcCfuUfcAfgguCf cAfcUfgGfasGfsg	uCfgUfcCfuUfcAfgguCf cAfcUfgGfasGfsg					
D1439	S1439	457	UfcCfaGfuGfgAfcCfuGf aAfgGfaCfgAfl96	UfcCfaGfuGfgAfcCfuGf aAfgGfaCfgAfl96	AS1439	1549	uCfgUfccuUfcAfgguCfcA fcUfgGfasGfsg	uCfgUfccuUfcAfgguCfcA fcUfgGfasGfsg					
D1440	S1440	458	CfcAfgUfgGfaCfcUfgAf aggAfcGfaGfL96	CfcAfgUfgGfaCfcUfgAf aggAfcGfaGfL96	AS1440	1550	cUfcGfuCfcUfuCfaggUf cCfaCfuGfsgAfsa	cUfcGfuCfcUfuCfaggUf cCfaCfuGfsgAfsa					
D1441	S1441	459	CfcAfgUfgGfaCfcUfgAf aGfGfAfcGfaGfL96	CfcAfgUfgGfaCfcUfgAf aGfGfAfcGfaGfL96	AS1441	1551	cUfcGfuuccUfuCfaggUfcC faCfuGfsgAfsa	cUfcGfuuccUfuCfaggUfcC faCfuGfsgAfsa					
D1442	S1442	460	CfaGfuGfgAfcCfuUfgGfaAf ggaCfgAfgGfL96	CfaGfuGfgAfcCfuUfgGfaAf ggaCfgAfgGfL96	AS1442	1552	cCfuCfgUfcCfuUfcagGf uCfcAfcUfsgGfsa	cCfuCfgUfcCfuUfcagGf uCfcAfcUfsgGfsa					

D1443	S1443	461	CfaGfuGfgAfcCfUfGfaAf gGfAfcGfAfgGfL96	AS1443	1553	cCfuCfugCfuUfcagGfu CfcAfcUfsgGfsa			
D1444	S1444	462	AfgUfgGfaCfcUfGfAfaGf gacGfaGfgGfL96	AS1444	1554	cCfcUfcGfUfCfcUfucaGf gUfcCfaCfusGfsg			
D1445	S1445	463	AfgUfgGfaCfcUfGfAfaGf gAfcGfaGfgGfL96	AS1445	1555	cCfcUfcgUfcUfucaGfgU fcCfaCfusGfsg			
D1446	S1446	464	GfuGfgAfcCfuGfaAfGfGf acgAfgGfgAfl96	AS1446	1556	uCfcCfuCfGfUfcCfuucAf gGfuCfcAfcUfsg			
D1447	S1447	465	GfuGfgAfcCfuGfaAfGfGf aCfGfAfgGfgAfl96	AS1447	1557	uCfcCfuugUfcCfuucAfGg fuCfcAfcUfsg			
D1448	S1448	466	UfgGfaCfcUfgAfaGfAfc gaGfgGfaUfl96	AS1448	1558	aUfcCfcUfcGfUfcCfuucCf aGfgUfcCfasCfsu			
D1449	S1449	467	UfgGfaCfcUfgAfaGfAfc GfaGfgGfaUfl96	AS1449	1559	aUfcCfcuGfuCfcuuCfa GfgUfcCfasCfsu			
D1450	S1450	468	GfgAfcCfuGfaAfGfGfaCf gagGfgAfuGfL96	AS1450	1560	cAfuCfcCfUfcGfUfcUf cAfgGfuCfcsAfcsc			
D1451	S1451	469	GfgAfcCfuGfaAfGfGfaCf gAfgGfgAfuGfL96	AS1451	1561	cAfuCfcuGfgUfcuUfcA fgGfuCfcsAfcsc			
D1452	S1452	470	GfaCfcUfgAfaGfAfcGf aggGfaUfgGfL96	AS1452	1562	cCfaUfcCfcUfcGfuucUf uCfaGfgUfcsCfsa			
D1453	S1453	471	GfaCfcUfgAfaGfAfcGf aGfgGfaUfgGfL96	AS1453	1563	cCfaUfcuUfcGfuucUfuC faGfgUfcsCfsa			
D1454	S1454	472	AfcCfuGfaAfgGfAfcGfAfg ggAfuGfgGfL96	AS1454	1564	cCfcAfuCfcCfuCfugCf uUfcAfgGfusCfsc			
D1455	S1455	473	AfcCfuGfaAfgGfAfcGfAfg	AS1455	1565	cCfcAfuucCfuCfugCfuU			

D1456	S1456	474	GfGfAfuGfgGfL96	AS1456	1566	fcAfgGfusCfsc				
D1457	S1457	475	CfcUfgAfaGfgAfCfGfaGf ggaUfgGfgAfL96	AS1456	1566	uCfcCfaUfcCfCfcUfcguCf cUfuCfaGfGfsUfsc				
D1458	S1458	476	CfcUfgAfaGfgAfCfGfaGf gGfAfUfgGfgAfL96	AS1457	1567	uCfcCfaucCfCfUfcguCfcU fuCfaGfGfsUfsc				
D1459	S1459	477	CfuGfaAfgGfaCfGfAfgGf gauGfgGfaUfL96	AS1458	1568	aUfcCfcAfUfcCfucgUf cCfuUfcAfGfsGfsu				
D1460	S1460	478	CfuGfaAfgGfaCfGfAfgGf gAfUfgGfgGfaUfL96	AS1459	1569	aUfcCfcauCfCfucgUfcC fuUfcAfGfsGfsu				
D1461	S1461	479	UfgAfaGfgAfcGfAfGfgGf augGfgAfuUfL96	AS1460	1570	aAfuCfcCfAfUfcCfoucGf uCfcUfuCfGfsGfsg				
D1462	S1462	480	UfgAfaGfgAfcGfAfGfgGf aUfgGfgAfuUfL96	AS1461	1571	aAfuCfccaUfcCfoucGfuC fcUfuCfGfsGfsg				
D1463	S1463	481	GfaAfgGfaCfGfAfGfgAf uggGfaUfuUfL96	AS1462	1572	aAfaUfcCfCfAfUfcCfoucCf gUfcCfuUfcsAfsg				
D1464	S1464	482	GfaAfgGfaCfGfAfGfgAf uGfGfGfaUfuUfL96	AS1463	1573	aAfaUfcccAfuCfoucCfGfU fcCfuUfcsAfsg				
D1465	S1465	483	AfaGfgAfcGfaGfGfGfaUf gggAfuUfuCfL96	AS1464	1574	gAfaAfuCfCfCfaUfcccUf cGfuCfcUfusCfGsa				
D1466	S1466	484	AfaGfgAfcGfaGfGfGfaUf gGfGfAfuUfuCfL96	AS1465	1575	gAfaAfuCfCfaUfcccUfcG fuCfcUfusCfGsa				
D1467	S1467	485	AfgGfaCfGfAfgGfGfAfuGf ggaUfuUfcAfL96	AS1466	1576	uGfaAfaUfcCfCfaUfcccCf uCfGfUfcCfusUfsc				
D1467	S1467	485	AfgGfaCfGfAfgGfGfAfuGf gGfAfUfuUfcAfL96	AS1467	1577	uGfaAfaucCfCfaUfcccCfuC fgUfcCfusUfsc				

D1468	S1468	486	GfgAfcGfaGfgGfAfuUfgGf gauUfuCfaUfL96	AS1468	1578	aUfgAfaAfuUfcCfcaucCf cUfcGfuCfcsUfsu			
D1469	S1469	487	GfgAfcGfaGfgGfAfuUfgGf gAfuUfuCfaUfL96	AS1469	1579	aUfgAfaauCfcCfaucCfcU fcGfuCfcsUfsu			
D1470	S1470	488	GfaCfgAfgGfgAfuUfgGfgGf auuUfcAfuGfL96	AS1470	1580	cAfuGfaAfaUfcCfcauCf cCfuCfgUfcsCfsu			
D1471	S1471	489	GfaCfgAfgGfgAfuUfgGfgGf aUfuUfcAfuGfL96	AS1471	1581	cAfuGfaaaUfcCfcauCfcC fuCfgUfcsCfsu			
D1472	S1472	490	AfcGfaGfgGfaUfgGfgAfu uuuCfaUfgUfL96	AS1472	1582	aCfaUfgAfaAfuCfccaUf cCfcUfcGfusCfsc			
D1473	S1473	491	AfcGfaGfgGfaUfgGfgAfu uUfuCfaUfgUfL96	AS1473	1583	aCfaUfgaaAfuCfccaUfcC fcUfcGfusCfsc			
D1474	S1474	492	CfgAfgGfgAfuGfgGfgAfu uuuAfuGfuAfuL96	AS1474	1584	uAfcAfuGfaAfaUfcccAfu CfcCfuCfcsUfsc			
D1475	S1475	493	CfgAfgGfgAfuGfgGfgAfu uUfuCfaUfgUfL96	AS1475	1585	uAfcAfuAfaUfcccAfuC fcCfuCfcsUfsc			
D1476	S1476	494	GfaGfgGfaUfgGfgAfuUf ucaUfgUfaAfuL96	AS1476	1586	uUfaCfaUfgAfaAfuuccCf aUfcCfcUfcsGfsu			
D1477	S1477	495	GfaGfgGfaUfgGfgAfuUf uCfaUfgUfaAfuL96	AS1477	1587	uUfaCfaugAfaAfuuccCfaU fcCfcUfcsGfsu			
D1478	S1478	496	AfgGfgAfuGfgGfgAfuUfuUf cauGfuAfaCfL96	AS1478	1588	gUfuAfcAfuUfgAfaAfuuccCf cAfuCfcCfusCfsg			
D1479	S1479	497	AfgGfgAfuGfgGfgAfuUfuUf cAfuUfgUfaAfuCfL96	AS1479	1589	gUfuAfcuuGfaAfaucCfcA fuCfcCfusCfsg			
D1480	S1480	498	GfgGfaUfgGfgAfuUfuUfCf	AS1480	1590	gGfuUfaCfaUfuUfgAfaauCf			

D1481	S1481	499	augUfaAfcCfL96	GfgGfaUfgGfgAfuUfuCfaUfGfUfaAfcCfL96	AS1481	1591	cCfaUfcCfcsUfsc	gGfuUfacaUfgAfaauCfcCfaUfcCfcsUfsc				
D1482	S1482	500	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfuguAfaCfcAfl96	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfuguAfaCfcAfl96	AS1482	1592	uGfgUfuAfcAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu	uGfgUfuAfcAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu				
D1483	S1483	501	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfugUfaAfaCfcAfl96	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfugUfaAfaCfcAfl96	AS1483	1593	uGfgUfuacAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu	uGfgUfuacAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu				
D1484	S1484	502	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfguaAfcCfaAfl96	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfguaAfcCfaAfl96	AS1484	1594	uUfgGfuUfAfcAfuUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc	uUfgGfuUfAfcAfuUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc				
D1485	S1485	503	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfl96	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfl96	AS1485	1595	uUfgGfuuaCfaUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc	uUfgGfuuaCfaUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc				
D1486	S1486	504	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfuaaCfcAfaGfl96	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfuaaCfcAfaGfl96	AS1486	1596	cUfuGfgUfuUfcAfuGfaAfuUfcCfcAfusCfsc	cUfuGfgUfuUfcAfuGfaAfuUfcCfcAfusCfsc				
D1487	S1487	505	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfUfaAfcCfaAfaGfl96	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfUfaAfcCfaAfaGfl96	AS1487	1597	cUfuGfguuAfcAfuGfaAfuUfcCfcAfusCfsc	cUfuGfguuAfcAfuGfaAfuUfcCfcAfusCfsc				
D1488	S1488	506	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaCfcAfaGfl96	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaCfcAfaGfl96	AS1488	1598	uCfuUfgGfUfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	uCfuUfgGfUfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc				
D1489	S1489	507	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaCfcAfaGfl96	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaCfcAfaGfl96	AS1489	1599	uCfuUfgguUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	uCfuUfgguUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc				
D1490	S1490	508	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaaccAfaGfaGfl96	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaaccAfaGfaGfl96	AS1490	1600	cUfcUfuGfUfuAfcAuGfaAfaUfcCfcsAfsu	cUfcUfuGfUfuAfcAuGfaAfaUfcCfcsAfsu				
D1491	S1491	509	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaCfcAfaGfaGfl96	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaCfcAfaGfaGfl96	AS1491	1601	cUfcUfuggUfuAfcAuGfaAfaUfcCfcsAfsu	cUfcUfuggUfuAfcAuGfaAfaUfcCfcsAfsu				
D1492	S1492	510	GfgAfuUfuCfaUfgUfaAfaaccAfgAfgUfl96	GfgAfuUfuCfaUfgUfaAfaaccAfgAfgUfl96	AS1492	1602	aCfuCfuUfgGfUfuUfacaUfgAfaAfuCfcsCfsa	aCfuCfuUfgGfUfuUfacaUfgAfaAfuCfcsCfsa				

D1493	S1493	511	GfgAfuUfuCfaUfgUfaAf cCfAfAfgUfL96	AS1493	1603	aCfuCfuugGfuUfacaUfg AfaAfuCfcsCfsc			
D1494	S1494	512	GfaUfuUfcAfuGfUfAfaCf caaGfaGfuAfL96	AS1494	1604	uAfcUfcUfUfGfgUfuacAf uGfaAfaUfcsCfsc			
D1495	S1495	513	GfaUfuUfcAfuGfUfAfaCf cAfAfGfaGfuAfL96	AS1495	1605	uAfcUfcuuGfgUfuacAfu GfaAfaUfcsCfsc			
D1496	S1496	514	AfuUfuCfaUfgUfAfAfcCfa agAfgUfaUfL96	AS1496	1606	aUfaCfuCfuUfgGfuuacCf aUfgAfaAfusCfsc			
D1497	S1497	515	AfuUfuCfaUfgUfAfAfcCfa AfGfAfgUfaUfL96	AS1497	1607	aUfaCfucuUfgGfuuacCfa UfgAfaAfusCfsc			
D1498	S1498	516	UfuUfcAfuGfuAfAfcCfaAfa gaGfuAfuUfL96	AS1498	1608	aAfuAfcUfcUfuGfguuAf cAfuGfaAfasUfsc			
D1499	S1499	517	UfuUfcAfuGfuAfAfcCfaAfa GfAfGfuAfuUfL96	AS1499	1609	aAfuAfcucUfuGfguuAfcA fuGfaAfasUfsc			
D1500	S1500	518	UfuCfaUfgUfaAfCfCfaAf gagUfaUfuCfL96	AS1500	1610	gAfaUfaCfUfCfuUfgguUf aCfaUfgAfasAfsu			
D1501	S1501	519	UfuCfaUfgUfaAfCfCfaAf gAfGfUfaUfuCfL96	AS1501	1611	gAfaUfacuCfuUfgguUfa CfaUfgAfasAfsu			
D1502	S1502	520	UfcAfuGfuAfaCfCfaAfaGf aguAfuUfcCfL96	AS1502	1612	gGfaAfuAfcUfcUfuggUf uAfcAfuGfasAfsa			
D1503	S1503	521	UfcAfuGfuAfaCfCfaAfaGf aGfUfAfuUfcCfL96	AS1503	1613	gGfaAfuacUfcUfuggUfu AfcAfuGfasAfsa			
D1504	S1504	522	CfaUfgUfaAfcCfaAfAfgAfg uaUfuCfcaL96	AS1504	1614	uGfgAfaUfaCfuCfuugGf uUfaCfaUfgsAfsa			
D1505	S1505	523	CfaUfgUfaAfcCfaAfAfgAfg	AS1505	1615	uGfgAfaaaCfuCfuugGfu			

D1506	S1506	524	UfaUfuCfcAflL96	AfuGfuAfaCfcAfaCfaGf uauUfcCfaUflL96	AS1506	1616	UfaCfaUfgsAfsa	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGf gUfuAfcAfusGfsa				
D1507	S1507	525	UfaUfuCfcAflL96	AfuGfuAfaCfcAfaCfaGf uAfuUfcCfaUflL96	AS1507	1617	UfaCfaUfgsAfsa	aUfgGfaauAfcUfcuuGfg UfuAfcAfusGfsa				
D1508	S1508	526	UfaUfuCfcAflL96	UfgUfaAfcCfaAfgAfgUfa uuCfcAfuUflL96	AS1508	1618	UfaCfaUfgsAfsa	aAfuGfgAfaUfaCfucuUf gGfuUfaCfasUfsg				
D1509	S1509	527	UfaUfuCfcAflL96	UfgUfaAfcCfaAfgAfgUfa UfUfcCfaUfuUflL96	AS1509	1619	UfaCfaUfgsAfsa	aAfuGfgaaUfaCfucuUfg GfuUfaCfasUfsg				
D1510	S1510	528	UfaUfuCfcAflL96	GfuAfaCfcAfaGfaGfuAfa uucCfaUfuUflL96	AS1510	1620	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaUfgGfaAfaAfcucUf uGfgUfuAfcAfsu				
D1511	S1511	529	UfaUfuCfcAflL96	GfuAfaCfcAfaGfaGfuAfa uUfcCfaUfuUflL96	AS1511	1621	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaUfggaaAfaAfcucUfuG fgUfuAfcAfsu				
D1512	S1512	530	UfaUfuCfcAflL96	UfaAfcCfaAfgAfgUfaUfu ccAfuUfuUflL96	AS1512	1622	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaAfuGfgAfaUfacuUf uUfgGfuUfasCfsa				
D1513	S1513	531	UfaUfuCfcAflL96	UfaAfcCfaAfgAfgUfaUfu CfcAfuUfuUflL96	AS1513	1623	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaAfuGfgAfaUfacuUfuU fgGfuUfasCfsa				
D1514	S1514	532	UfaUfuCfcAflL96	AfaCfcAfaGfaGfuAfuUfc caUfuUfuUflL96	AS1514	1624	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaAfaUfgGfaAfuacUf cUfuGfgUfusAfcsc				
D1515	S1515	533	UfaUfuCfcAflL96	AfaCfcAfaGfaGfuAfuUfc CfaUfuUfuUflL96	AS1515	1625	UfaCfaUfgsAfsa	aAfaAfaugGfaAfuacUfuU fuGfgUfusAfcsc				
D1516	S1516	534	UfaUfuCfcAflL96	AfcCfaAfgAfgUfaUfuCfc auUfuUfuUflL96	AS1516	1626	UfaCfaUfgsAfsa	uAfaAfaUfgGfaAfaucUf uUfuUfgGfusUfsa				
D1517	S1517	535	UfaUfuCfcAflL96	AfcCfaAfgAfgUfaUfuCfc AfuUfuUfuUflL96	AS1517	1627	UfaCfaUfgsAfsa	uAfaAfaauGfgAfaucUfu CfuUfgGfusUfsa				

D1518	S1518	536	CfcAfaGfaGifuAfuUfcCf auuUfuUfaCfL96	AS1518	1628	gUfaAfaAfaUfgGfaauAf cUfcUfuGfGsUfsu			
D1519	S1519	537	CfcAfaGfaGifuAfuUfcCf aUfUfuUfaCfL96	AS1519	1629	gUfaAfaaaUfgGfaauAfc UfcUfuGfGsUfsu			
D1520	S1520	538	CfaAfgUfaUfuUfcCfaUf uuUfaAfcUfL96	AS1520	1630	aGifuAfaAfaUfgGfaaUf aCfuCfuUfGsGfsu			
D1521	S1521	539	CfaAfgUfaUfuUfcCfaUf UfUfuAfcUfL96	AS1521	1631	aGifuAfaaaAfuGfgaaUfa CfuCfuUfGsGfsu			
D1522	S1522	540	AfaGfaGfaAfuUfcCfaUf uuUfaCfuAFL96	AS1522	1632	uAfgUfaAfaUfggaAf uAfcUfcUfusGfsg			
D1523	S1523	541	AfaGfaGfaAfuUfcCfaUf uUfUfaCfuAFL96	AS1523	1633	uAfgUfaaaAfaUfggaAfuA fcUfcUfusGfsg			
D1524	S1524	542	AfgAfgUfaUfuUfcCfaUf uuAfcUfaAFL96	AS1524	1634	uUfaGfuAfaAfaUfggAf aUfaCfuCfusUfsg			
D1525	S1525	543	AfgAfgUfaUfuUfcCfaUf UfUfaCfuAfaAFL96	AS1525	1635	uUfaGfuuaAfaUfggAfa UfaCfuCfusUfsg			
D1526	S1526	544	GfaGfaAfuUfcCfaUfUf uuuAfaAfaAFL96	AS1526	1636	uUfuAfgUfaAfaUfaugGf aAfuAfcUfcsUfsu			
D1527	S1527	545	GfaGfaAfuUfcCfaUfUf uUfaCfuAfaAFL96	AS1527	1637	uUfuAfguaAfaUfaugGfa AfuAfcUfcsUfsu			
D1528	S1528	546	AfgUfaUfuUfcCfaUfUf acUfaAfaGfL96	AS1528	1638	cUfuUfaGfuAfaAfaaGf gAfaUfaCfusCfsu			
D1529	S1529	547	AfgUfaUfuUfcCfaUfUf AfCfuAfaAfaGfL96	AS1529	1639	cUfuUfaguAfaAfaaGfg AfaUfaCfusCfsu			
D1530	S1530	548	GfuAfuUfcCfaUfUfUfUf	AS1530	1640	gCfuUfuAfgUfaAfaaaUf			

D1531	S1531	549	acuAfaAfgCfL96	GfuAfuUfcCfaUfUfUfuUf aCfUfAfaAfgCfL96	AS1531	1641	gGfaAfuAfcUfsc				
D1532	S1532	550	UfaUfuCfcAfuUfUfUfuAfc uaAfaGfcAfl96	UfaUfuCfcAfuUfUfUfuAfc uaAfaGfcAfl96	AS1532	1642	uGfcUfuUfAfgUfaaaAf uGfgAfaUfasCfsu				
D1533	S1533	551	UfaUfuCfcAfuUfUfUfuAfc UfaAfaGfcAfl96	UfaUfuCfcAfuUfUfUfuAfc UfaAfaGfcAfl96	AS1533	1643	uGfcUfuuaGfuAfaaaAfu GfgAfaUfasCfsu				
D1534	S1534	552	AfuUfcCfaUfuUfUfUfaCf uaaAfgCfaGfL96	AfuUfcCfaUfuUfUfUfaCf uaaAfgCfaGfL96	AS1534	1644	cUfgCfuUfUfAfgUfaaaAf aUfgGfaAfusAfcsc				
D1535	S1535	553	AfuUfcCfaUfuUfUfUfaCf uAfaAfgCfaGfL96	AfuUfcCfaUfuUfUfUfaCf uAfaAfgCfaGfL96	AS1535	1645	cUfgCfuuuAfgUfaaaAfa UfgGfaAfusAfcsc				
D1536	S1536	554	UfuCfcAfuUfuUfUfAfcUfa aaGfcAfgUfL96	UfuCfcAfuUfuUfUfAfcUfa aaGfcAfgUfL96	AS1536	1646	aCfuGfcUfuUfUfaGfuuaAf aAfuGfgAfasUfisa				
D1537	S1537	555	UfuCfcAfuUfuUfUfAfcUfa AfaGfcAfgUfL96	UfuCfcAfuUfuUfUfAfcUfa AfaGfcAfgUfL96	AS1537	1647	aCfuGfcuuUfaGfuuaAfa AfuGfgAfasUfisa				
D1538	S1538	556	UfcCfaUfuUfuUfAfcUfa agCfaGfuGfL96	UfcCfaUfuUfuUfAfcUfa agCfaGfuGfL96	AS1538	1648	cAfcUfgCfUfUfAfguaAf aAfaUfgGfasAfsu				
D1539	S1539	557	UfcCfaUfuUfuUfAfcUfa AfgCfaGfuGfL96	UfcCfaUfuUfuUfAfcUfa AfgCfaGfuGfL96	AS1539	1649	cAfcUfgcuUfuAfguaAfaA faUfgGfasAfsu				
D1540	S1540	558	CfcAfuUfuUfuAfcUfaAfa gcAfgUfgUfL96	CfcAfuUfuUfuAfcUfaAfa gcAfgUfgUfL96	AS1540	1650	aCfaCfuGfcUfuUfaguAf aAfaAfuGfgsAfsa				
D1541	S1541	559	CfcAfuUfuUfuAfcUfaAfa GfcAfgUfgUfL96	CfcAfuUfuUfuAfcUfaAfa GfcAfgUfgUfL96	AS1541	1651	aCfaCfugcUfuUfaguAfa AfaAfuGfgsAfsa				
D1542	S1542	560	CfaUfuUfuUfaCfUfaAfa gcaGfuGfuUfL96	CfaUfuUfuUfaCfUfaAfa gcaGfuGfuUfL96	AS1542	1652	aAfcAfcUfgCfUfuUfuagUf aAfaAfaUfgsGfisa				

D1543	S1543	561	CfaUfuUfuUfaCfuAfaAf gCfAfgfuGfuUfL96	AS1543	1653	aAfcAfcugCfuUfuagUfaA faAfaUfsgGfisa			
D1544	S1544	562	AfuUfuUfuAfcUfAfaGfc agUfgUfuUfL96	AS1544	1654	aAfaCfaCfuUfgCfuUfuuaGf uAfaAfaAfaUfsg			
D1545	S1545	563	AfuUfuUfuAfcUfAfaGfc AfgUfgUfuUfL96	AS1545	1655	aAfaCiacuGfcUfuuaGfu AfaAfaAfaUfsg			
D1546	S1546	564	UfuUfuUfaCfuAfaAfgCfa guGfuUfuUfL96	AS1546	1656	aAfaAfcAfcUfgCfuuuAfa gUfaAfaAfaUfsg			
D1547	S1547	565	UfuUfuUfaCfuAfaAfgCfa GfuUfgUfuUfL96	AS1547	1657	aAfaAfcacUfgCfuuuAfgU faAfaAfaUfsg			
D1548	S1548	566	UfuUfuAfcUfaAfaGfcAfg ugUfuUfuCfL96	AS1548	1658	gAfaAfaCfaCfuGfcuuUf aGfuAfaAfaUfsg			
D1549	S1549	567	UfuUfuAfcUfaAfaGfcAfg UfgUfuUfuCfL96	AS1549	1659	gAfaAfaCfuGfcuuUfa GfuAfaAfaUfsg			
D1550	S1550	568	UfuUfaCfuAfaAfgCfaGf uguUfuUfcaL96	AS1550	1660	uGfaAfaAfcAfcUfgcuUf uAfgUfaAfaUfsg			
D1551	S1551	569	UfuUfaCfuAfaAfgCfaGf uGfUfuUfcaL96	AS1551	1661	uGfaAfaacAfcUfgcuUfuA fgUfaAfaUfsg			
D1552	S1552	570	UfuAfcUfaAfaGfcAfgUfg uuUfuCfaCfL96	AS1552	1662	gUfgAfaAfaCfaCfugcUf uUfaGfuAfaUfsg			
D1553	S1553	571	UfuAfcUfaAfaGfcAfgUfg UfUfuCfaCfL96	AS1553	1663	gUfgAfaaaCfaCfugcUfu UfaGfuAfaUfsg			
D1554	S1554	572	UfaCfuAfaAfgCfaGfuGf uuuUfcafcCfL96	AS1554	1664	gGfuGfaAfaAfcAfcugCf uUfuAfgUfsgAfaUfsg			
D1555	S1555	573	UfaCfuAfaAfgCfaGfuGf	AS1555	1665	gGfuGfaaaaAfcAfcugCfu			

D1556	S1556	574	uUfUfCfAfcCfL96	AfcUfaAfaGfcAfGfUfgUfu uuCfaCfcUfL96	AS1556	1666	UfuAfgUfasAfsa	aGfgUfgAfaAfaCfacuGf cUfuUfaGfusAfsa					
D1557	S1557	575	AfcUfaAfaGfcAfGfUfgUfu UfUfCfaCfcUfL96	AS1557	1667	UfuUfaGfusAfsa	aGfgUfgaaAfaCfacuGfc UfuUfaGfusAfsa						
D1558	S1558	576	CfuAfaAfgCfaGfUfGfuUf uucAfcCfuCfL96	AS1558	1668	gAfgGfuGfAfaAfaCfacuUf gCfuUfuAfgsUfsa	gAfgGfuGfAfaAfaCfacuUf gCfuUfuAfgsUfsa						
D1559	S1559	577	CfuAfaAfgCfaGfUfGfuUf uUfCfAfcCfuCfL96	AS1559	1669	gAfgGfugaAfaAfcacUfgC fuUfuAfgsUfsa	gAfgGfugaAfaAfcacUfgC fuUfuAfgsUfsa						
D1560	S1560	578	UfaAfaGfcAfgUfGfUfuUf ucaCfcUfcAFL96	AS1560	1670	uGfaGfgUfGfAfaAfaCfaCf uGfcUfuUfasGfsu	uGfaGfgUfGfAfaAfaCfaCf uGfcUfuUfasGfsu						
D1561	S1561	579	UfaAfaGfcAfgUfGfUfuUf uCfAfcCfuCfL96	AS1561	1671	uGfaGfgugAfaAfaCfaCfu GfcUfuUfasGfsu	uGfaGfgugAfaAfaCfaCfu GfcUfuUfasGfsu						
D1562	S1562	580	AfaAfgCfaGfuGfUfUfuUf cacCfuCfaUfL96	AS1562	1672	aUfgAfgUfgUfgAfaAfaacAf cUfgCfuUfusAfsa	aUfgAfgUfgUfgAfaAfaacAf cUfgCfuUfusAfsa						
D1563	S1563	581	AfaAfgCfaGfuGfUfUfuUf cAfCfcCfuCfaUfL96	AS1563	1673	aUfgAfgguGfaAfaaacAfcU fgCfuUfusAfsa	aUfgAfgguGfaAfaaacAfcU fgCfuUfusAfsa						
D1564	S1564	582	AfaGfcAfgUfgUfUfUfuCf accUfcAfuAFL96	AS1564	1674	uAfuGfaGfGfUfgAfaaaaCf aCfuGfcUfusUfsa	uAfuGfaGfGfUfgAfaaaaCf aCfuGfcUfusUfsa						
D1565	S1565	583	AfaGfcAfgUfgUfUfUfuCf aCfCfUfcAfuAFL96	AS1565	1675	uAfuGfaggUfgAfaaaaCfa CfuGfcUfusUfsa	uAfuGfaggUfgAfaaaaCfa CfuGfcUfusUfsa						
D1566	S1566	584	AfgCfaGfuGfuUfUfUfcAf ccuCfaUfaUfL96	AS1566	1676	aUfaUfgAfGfGfuGfaaaaAf cAfcUfgCfusUfsu	aUfaUfgAfGfGfuGfaaaaAf cAfcUfgCfusUfsu						
D1567	S1567	585	AfgCfaGfuGfuUfUfUfcAf cCfUfCfaUfaUfL96	AS1567	1677	aUfaUfgagGfuGfaaaaAfc AfcUfgCfusUfsu	aUfaUfgagGfuGfaaaaAfc AfcUfgCfusUfsu						

D1568	S1568	586	GfcAfgUfgUfuUfUfCfaCf cucAfuAfuGfl96	AS1568	1678	cAfuAfuGfaGfgUfgaaAf aCfaCfuGfcsUfsu			
D1569	S1569	587	GfcAfgUfgUfuUfUfCfaCf cUfCfaAfuAfuGfl96	AS1569	1679	cAfuAfuGfaGfgUfgaaAfa CfaCfuGfcsUfsu			
D1570	S1570	588	CfaGfuGfuUfuUfCfaCf ucaUfaUfgCfl96	AS1570	1680	gCfaUfaUfGfaGfgGfugaAf aAfcAfcUfcsCfsu			
D1571	S1571	589	CfaGfuGfuUfuUfCfaCf uCfaUfaUfgCfl96	AS1571	1681	gCfaUfaugAfgGfugaAfa AfcAfcUfcsCfsu			
D1572	S1572	590	AfgUfgUfuUfuCfaCfCfcUfc auAfuGfcUfl96	AS1572	1682	aGfcAfuAfuUfGfaGfgugAf aAfaCfaCfusGfsc			
D1573	S1573	591	AfgUfgUfuUfuCfaCfCfcUfc AfUfaUfuGfcUfl96	AS1573	1683	aGfcAfuauGfaGfgugAfa AfaCfaCfusGfsc			
D1574	S1574	592	GfuGfuUfuUfCfaCfCfuCf auaUfgCfuAfl96	AS1574	1684	uAfgCfaUfaUfGfaGfgguGf aAfaAfcAfcUfcsUfsg			
D1575	S1575	593	GfuGfuUfuUfCfaCfCfuCf aUfaUfgCfuAfl96	AS1575	1685	uAfgCfauaUfgAfgguGfa AfaAfcAfcUfcsUfsg			
D1576	S1576	594	UfgUfuUfuCfaCfCfuCfCf uauGfcUfaUfl96	AS1576	1686	aUfaGfcAfuAfuGfaggUf gAfaAfaCfasCfsu			
D1577	S1577	595	UfgUfuUfuCfaCfCfuCfCf uAfUfgCfuAfl96	AS1577	1687	aUfaGfcuauAfuGfaggUfg AfaAfaCfasCfsu			
D1578	S1578	596	GfuUfuUfcAfcCfuUfCfaUf augCfuAfuGfl96	AS1578	1688	cAfuAfgCfaUfUfaUfgagGf uGfaAfaAfcAfcUfsc			
D1579	S1579	597	GfuUfuUfcAfcCfuUfCfaUf aUfgCfuAfuGfl96	AS1579	1689	cAfuAfgcaUfaUfgagGfu GfaAfaAfcAfcUfsc			
D1580	S1580	598	UfuUfuCfaCfcUfCfaUfaUfu	AS1580	1690	aCfaUfaGfcCfaUfaUfugaGf			

D1581	S1581	599	gcUfaUfgUfL96	UfuUfuCfaCfcUfCfAfuAfuGfCfUfaUfgUfL96	AS1581	1691	gUfgAfaAfasCfsa	aCfaUfagcAfuAfuagaGfgUfgAfaAfasCfsa				
D1582	S1582	600	UfuUfcAfcCfuCfAfuAfuUfgcuAfuGfuUfL96	UfuUfcAfcCfuCfAfuAfuUfgcuAfuGfuUfL96	AS1582	1692	aAfcAfuAfgCfaUfaugAfgGfuGfaAfasAfsa	aAfcAfuAfgCfaUfaugAfgGfuGfaAfasAfsa				
D1583	S1583	601	UfuUfcAfcCfuCfAfuAfuUfgCfUfaAfuGfuUfL96	UfuUfcAfcCfuCfAfuAfuUfgCfUfaAfuGfuUfL96	AS1583	1693	aAfcAfuagCfaUfaugAfgGfuGfaAfasAfsa	aAfcAfuagCfaUfaugAfgGfuGfaAfasAfsa				
D1584	S1584	602	UfuCfaCfcUfcAfuAfuGfcuaUfgUfuAfuL96	UfuCfaCfcUfcAfuAfuGfcuaUfgUfuAfuL96	AS1584	1694	uAfaCfaUfaAfgCfaAfuauGfaGfgUfgAfasAfsa	uAfaCfaUfaAfgCfaAfuauGfaGfgUfgAfasAfsa				
D1585	S1585	603	UfuCfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaUfgUfuAfuL96	UfuCfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaUfgUfuAfuL96	AS1585	1695	uAfaCfauaGfcAfuauGfaGfgUfgAfasAfsa	uAfaCfauaGfcAfuauGfaGfgUfgAfasAfsa				
D1586	S1586	604	UfcAfcCfuCfaUfaUfgCfuaGfuUfaGfuL96	UfcAfcCfuCfaUfaUfgCfuaGfuUfaGfuL96	AS1586	1696	cUfaAfcAfuAfgCfauaUfgAfgGfuGfasAfsa	cUfaAfcAfuAfgCfauaUfgAfgGfuGfasAfsa				
D1587	S1587	605	UfcAfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgGfuUfaGfuL96	UfcAfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgGfuUfaGfuL96	AS1587	1697	cUfaAfcuaAfgCfauaUfgAfgGfuGfasAfsa	cUfaAfcuaAfgCfauaUfgAfgGfuGfasAfsa				
D1588	S1588	606	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaugUfuAfgAfuL96	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaugUfuAfgAfuL96	AS1588	1698	uCfuAfaCfaUfaGfcuaUfgAfgGfgUfgsAfsa	uCfuAfaCfaUfaGfcuaUfgAfgGfgUfgsAfsa				
D1589	S1589	607	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaUfgGfuUfaAfgAfuL96	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfaUfgGfuUfaAfgAfuL96	AS1589	1699	uCfuAfaaUfaGfcuaUfgAfgGfgUfgsAfsa	uCfuAfaaUfaGfcuaUfgAfgGfgUfgsAfsa				
D1590	S1590	608	AfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgUfaGfaAfuL96	AfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgUfaGfaAfuL96	AS1590	1700	uUfcUfaAfcAfuAfgcaUfaUfgAfgGfusGfsa	uUfcUfaAfcAfuAfgcaUfaUfgAfgGfusGfsa				
D1591	S1591	609	AfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgUfuUfaGfaAfuL96	AfcCfuCfaUfaUfgCfuaUfgUfuUfaGfaAfuL96	AS1591	1701	uUfcUfaaacAfuAfgcaUfaUfgAfgGfusGfsa	uUfcUfaaacAfuAfgcaUfaUfgAfgGfusGfsa				
D1592	S1592	610	CfcUfcAfuAfuGfcUfaUfguuAfgAfaGfuL96	CfcUfcAfuAfuGfcUfaUfguuAfgAfaGfuL96	AS1592	1702	cUfuCfuAfaCfaUfagcAfuAfuGfaGfgsUfsg	cUfuCfuAfaCfaUfagcAfuAfuGfaGfgsUfsg				

D1593	S1593	611	CfcUfcAfuAfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfaGflL96	AS1593	1703	cUfuCfuuaCfaUfagcAfuAfuGfaGfgsUfsg			
D1594	S1594	612	CfuCfaUfaUfgCfuAfuGfuuuGfaAfgUfL96	AS1594	1704	aCfuUfcUfaAfaCfaUagCfaUfaUfgAfgsGfsu			
D1595	S1595	613	CfuCfaUfaUfgCfuAfuGfuUfAfgfaAfgUfL96	AS1595	1705	aCfuUfcuaAfaCfaUagCfaUfaUfgAfgsGfsu			
D1596	S1596	614	UfcAfuAfuGfcUfAfuUfgUfagAfaGfuCflL96	AS1596	1706	gAfcUfuCfuAfaCfauaGfcaAfuAfuGfasGfsg			
D1597	S1597	615	UfcAfuAfuGfcUfAfuUfgUfAfgAfaGfuCflL96	AS1597	1707	gAfcUfcuaAfaCfauaGfcaAfuGfasGfsg			
D1598	S1598	616	CfaUfaUfgCfuAfuGfuUfagaAfgUfcCflL96	AS1598	1708	gGfaCfuUfCfuAfaAfcuAfgCfaUfaUfgsAfg			
D1599	S1599	617	CfaUfaUfgCfuAfuGfuUfagaAfgUfcCflL96	AS1599	1709	gGfaCfuucUfaAfcuAfgCfaUfaUfgsAfg			
D1600	S1600	618	AfuAfuGfcUfaUfgUfUfAfgaaGfuCfcAflL96	AS1600	1710	uGfgAfcUfUfCfuAfaaUfaaGfaAfuAfuAfgsAfg			
D1601	S1601	619	AfuAfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfaGfuCfcAflL96	AS1601	1711	uGfgAfcuuCfuAfaaUfaGfaAfuAfuAfgsAfg			
D1602	S1602	620	UfaUfgCfuAfuGfuUfUfAfgaaUfcCfaGflL96	AS1602	1712	cUfgGfaCfuUfcUfaaCfaUfaUfgCfaUfasUfsg			
D1603	S1603	621	UfaUfgCfuAfuGfuUfUfAfgaaAfgUfcCfaGflL96	AS1603	1713	cUfgGfacuUfcUfaaCfaUfaUfasUfsg			
D1604	S1604	622	AfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfaGuCfcAfgGflL96	AS1604	1714	cCfuGfgAfcUfuCfuuaCfaUfaGfaAfuAfgsAfg			
D1605	S1605	623	AfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfa	AS1605	1715	cCfuGfgacUfuCfuuaCfa			

D1606	S1606	624	GfUfCfcAfgGfL96	UfgCfuAfuGfuUfaGfaAfgCfaGfgCfL96	AS1606	1716	UfaGfcAfusAfsu	gCfcUfgGfAfcUfucuaAfcAfuAfgCfasUfsa				
D1607	S1607	625	GfUfCfcAfgGfL96	UfgCfuAfuGfuUfaGfaAfgUfCfCfaGfgCfL96	AS1607	1717	UfaGfcAfusAfsu	gCfcUfgggaCfuUfucuaAfcAfuAfgCfasUfsa				
D1608	S1608	626	GfUfCfcAfgGfL96	GfcUfaUfgUfuAfgAfaGfuccAfgGfcAfl96	AS1608	1718	UfaGfcAfusAfsu	uGfcCfuGfGfAfcUfucuaAfcAfaUfaGfcsAfsu				
D1609	S1609	627	GfUfCfcAfgGfL96	GfcUfaUfgUfuAfgAfaGfuCfAfgGfcAfl96	AS1609	1719	UfaGfcAfusAfsu	uGfcCfuggAfcUfucuaAfaCfaUfaGfcsAfsu				
D1610	S1610	628	GfUfCfcAfgGfL96	CfuAfuGfuUfaGfaAfgUfccAfgCfaGfL96	AS1610	1720	UfaGfcAfusAfsu	cUfgCfcUfGfGfaCfuucUfaAfcAfuAfgCfasUfsa				
D1611	S1611	629	GfUfCfcAfgGfL96	CfuAfuGfuUfaGfaAfgUfccAfgCfaGfL96	AS1611	1721	UfaGfcAfusAfsu	cUfgCfcugGfaCfuucUfaAfcAfuAfgCfasUfsa				
D1612	S1612	630	GfUfCfcAfgGfL96	UfaUfgUfuAfgAfaGfucagGfcAfgAfl96	AS1612	1722	UfaGfcAfusAfsu	uCfuGfcCfuUfgGfaCfuucUfaAfaCfaUfasGfsc				
D1613	S1613	631	GfUfCfcAfgGfL96	UfaUfgUfuAfgAfaGfucAfgGfcAfgAfl96	AS1613	1723	UfaGfcAfusAfsu	uCfuGfccuGfgAfcuuCfuAfaCfaUfasGfsc				
D1614	S1614	632	GfUfCfcAfgGfL96	AfuGfuUfaGfaAfgUfccAfgCfaGfaGfL96	AS1614	1724	UfaGfcAfusAfsu	cUfcUfgCfcUfgGfaCfuUfcUfaAfcAfusAfsu				
D1615	S1615	633	GfUfCfcAfgGfL96	AfuGfuUfaGfaAfgUfccAfgCfaGfaGfL96	AS1615	1725	UfaGfcAfusAfsu	cUfcUfgccUfgGfaCfuUfcUfaAfcAfusAfsu				
D1616	S1616	634	GfUfCfcAfgGfL96	UfgUfuAfgAfaGfUfcAfggcAfgAfgAfl96	AS1616	1726	UfaGfcAfusAfsu	uCfuCfuGfCfcUfgGfaCfuUfcUfaAfcAfusAfsu				
D1617	S1617	635	GfUfCfcAfgGfL96	UfgUfuAfgAfaGfUfcAfgGfcAfgAfgAfl96	AS1617	1727	UfaGfcAfusAfsu	uCfuCfugcCfuGfgacUfuCfuAfaCfasUfsa				

D1618	S1618	636	GfuUfaGfaAfgUfcCfaGf gcaGfaGfaCfl96	AS1618	1728	gUfcUfcUfgCfcUfggaCf uUfcUfaAfcAfsu			
D1619	S1619	637	GfuUfaGfaAfgUfcCfaGf gCfAfgGfaGfaCfl96	AS1619	1729	gUfcUfcugCfcUfggaCfu UfcUfaAfcAfsu			
D1620	S1620	638	UfuAfgAfaGfuCfAfgGf cagAfgAfcAfl96	AS1620	1730	uGfuCfuCfUfgCfcuggAf cUfuCfuAfcAfsa			
D1621	S1621	639	UfuAfgAfaGfuCfAfgGf cAfgAfgAfcAfl96	AS1621	1731	uGfuCfucuGfcCfuggAfc UfuCfuAfcAfsa			
D1622	S1622	640	UfaGfaAfgUfcCfaGfCf agaGfaCfaAfl96	AS1622	1732	uUfgUfcUfcUfgCfcugGf aCfuUfcUfcAfsa			
D1623	S1623	641	UfaGfaAfgUfcCfaGfCf aGfAfgAfaAfl96	AS1623	1733	uUfgUfcucUfgCfcugGfa CfuUfcUfcAfsa			
D1624	S1624	642	AfgAfaGfuCfcAfgGfAfg agAfcAfaUfl96	AS1624	1734	aUfuGfuCfUfcUfgGfcuGf gAfcUfuCfusAfsa			
D1625	S1625	643	AfgAfaGfuCfcAfgGfAfg AfgAfcAfaUfl96	AS1625	1735	aUfuGfucuCfuGfcuGfg AfcUfuCfusAfsa			
D1626	S1626	644	GfaAfgUfcCfaGfCfaGf agaCfaAfaUfl96	AS1626	1736	uAfuUfgUfcUfcUfgccUf gGfaCfuUfcAfsa			
D1627	S1627	645	GfaAfgUfcCfaGfCfaGf aGfAfcAfaUfl96	AS1627	1737	uAfuUfgucUfcUfgccUfgG faCfuUfcAfsa			
D1628	S1628	646	AfaGfuCfcAfgGfCfaGf acAfaUfaAfl96	AS1628	1738	uUfaUfuGfUfcUfcugCf uGfgAfcUfcAfsa			
D1629	S1629	647	AfaGfuCfcAfgGfCfaGf AfcAfaUfaAfl96	AS1629	1739	uUfaUfuguCfuCfugCfu GfgAfcUfcAfsa			
D1630	S1630	648	AfgUfcCfaGfgCfaGfaGf	AS1630	1740	uUfuAfuUfgUfcUfcugCf			

D1631	S1631	649	acaAfuAfaAflL96	AfgUfcCfaGfgCfaAfaAflL96	AS1631	1741	cUfgGfaCfusUfsc	uUfuAfuugUfcUfcugCfcUfgGfaCfusUfsc				
D1632	S1632	650	GfuCfcAfgGfcAfgAfaAflL96	GfuCfcAfgGfcAfgAfaAflL96	AS1632	1742	uUfuUfaUfuUfgGfuCfucuGfcCfuGfgAfcUfsu	uUfuUfaUfuUfgGfuCfucuGfcCfuGfgAfcUfsu				
D1633	S1633	651	GfuCfcAfgGfcAfgAfaAflL96	GfuCfcAfgGfcAfgAfaAflL96	AS1633	1743	uUfuUfauuGfuCfucuGfcCfuGfgAfcUfsu	uUfuUfauuGfuCfucuGfcCfuGfgAfcUfsu				
D1634	S1634	652	UfcCfaGfgCfaGfaAfaAflL96	UfcCfaGfgCfaGfaAfaAflL96	AS1634	1744	gUfuUfuAfuUfgUfcucUfgCfcUfgGfasCfsu	gUfuUfuAfuUfgUfcucUfgCfcUfgGfasCfsu				
D1635	S1635	653	UfcCfaGfgCfaGfaAfaAflL96	UfcCfaGfgCfaGfaAfaAflL96	AS1635	1745	gUfuUfuuuUfgUfcucUfgCfcUfgGfasCfsu	gUfuUfuuuUfgUfcucUfgCfcUfgGfasCfsu				
D1636	S1636	654	CfcAfgGfcAfgAfaAflL96	CfcAfgGfcAfgAfaAflL96	AS1636	1746	uGfulUfuUfaAfuGfucuCfuGfcCfuGfgsAfc	uGfulUfuUfaAfuGfucuCfuGfcCfuGfgsAfc				
D1637	S1637	655	CfcAfgGfcAfgAfaAflL96	CfcAfgGfcAfgAfaAflL96	AS1637	1747	uGfulUfuuuUfuGfucuCfuGfcCfuGfgsAfc	uGfulUfuuuUfuGfucuCfuGfcCfuGfgsAfc				
D1638	S1638	656	CfaGfgCfaGfaAfaAflL96	CfaGfgCfaGfaAfaAflL96	AS1638	1748	aUfgUfuUfuAfuUfgucUfcUfgCfcUfgsGfsa	aUfgUfuUfuAfuUfgucUfcUfgCfcUfgsGfsa				
D1639	S1639	657	CfaGfgCfaGfaAfaAflL96	CfaGfgCfaGfaAfaAflL96	AS1639	1749	aUfgUfuuuAfuUfgucUfcUfgCfcUfgsGfsa	aUfgUfuuuAfuUfgucUfcUfgCfcUfgsGfsa				
D1640	S1640	658	AfgGfcAfgAfaAflL96	AfgGfcAfgAfaAflL96	AS1640	1750	aAfuGfuUfuUfaUfuguCfuCfuGfcCfusGfsg	aAfuGfuUfuUfaUfuguCfuCfuGfcCfusGfsg				
D1641	S1641	659	AfgGfcAfgAfaAflL96	AfgGfcAfgAfaAflL96	AS1641	1751	aAfuGfuuuUfaUfuguCfuCfuGfcCfusGfsg	aAfuGfuuuUfaUfuguCfuCfuGfcCfusGfsg				
D1642	S1642	660	GfgCfaGfaAfaAflL96	GfgCfaGfaAfaAflL96	AS1642	1752	gAfaUfgUfuUfuAfuugUfcUfcUfgCfcUfsu	gAfaUfgUfuUfuAfuugUfcUfcUfgCfcUfsu				

D1656	S1656	674	CfCfUfgUfgAflL96	AS1656	1766	AfuUfgUfcsUfsc	uUfcAfcAfcGfGfaAfuUf uUfaUfuGfusCfsu				
D1657	S1657	675	AfcAfaUfaAfaAfcAfuUfc CfUfgGfaAflL96	AS1657	1767	uUfcAfcagGfaAfuUfu UfaUfuGfusCfsu					
D1658	S1658	676	AfaAfaAfaAfaCfAfuUfc UfgAfaAflL96	AS1658	1768	uUfuCfaCfAfcGfAfaugUf uUfuAfuUfcsUfsc					
D1659	S1659	677	CfaAfuAfaAfaCfAfuUfc UfgUfaAflL96	AS1659	1769	uUfuCfiacaGfgAfaugUfu UfuAfuUfcsUfsc					
D1660	S1660	678	AfaUfaAfaAfaAfuUfcCfu guGfaAfaGflL96	AS1660	1770	cUfuUfcAfcAfcGfaauGf uUfuUfaUfusGfsu					
D1661	S1661	679	AfaUfaAfaAfaAfuUfcCfu GfUfgAfaAfaGflL96	AS1661	1771	cUfuUfcacAfcGfaauGfu UfuUfaUfusGfsu					
D1662	S1662	680	AfuAfaAfaCfaUfUfcUfg ugAfaAfgGflL96	AS1662	1772	cCfuUfuCfAfcCfaGfgaaUf gUfuUfuAfusUfsg					
D1663	S1663	681	AfuAfaAfaCfaUfUfcUfg UfgAfaAfaGflL96	AS1663	1773	cCfuUfucaCfaGfgaaUfg UfuUfuAfusUfsg					
D1664	S1664	682	UfaAfaAfaAfuUfcCfuGfu gaAfaGfgCflL96	AS1664	1774	gCfcUfuUfcAfcAfggaAf uGfuUfuUfasUfcsUfsc					
D1665	S1665	683	UfaAfaAfaAfuUfcCfuGfu GfAfaAfaGfgCflL96	AS1665	1775	gCfcUfuucAfcAfggaAfuG fuUfuUfasUfcsUfsc					
D1666	S1666	684	AfaAfaCfaUfuCfCfuUfgUf gaaAfgGfcAflL96	AS1666	1776	uGfcCfuUfuUfcCfaCfaggAf aUfgUfuUfusAfsu					
D1667	S1667	685	AfaAfaCfaUfuCfCfuUfgUf gAfaAfaGfcAflL96	AS1667	1777	uGfcCfuuuCfaCfaggAfa UfgUfuUfusAfsu					

D1668	S1668	686	AfaAfcAfuUfcCfUfGfuGfa aaGfgCfaCfL96	AS1668	1778	gUfgCfcUfuUfcAfcagGf aAfuGfuUfusUfisa			
D1669	S1669	687	AfaAfcAfuUfcCfUfGfuGfa AfaGfgCfaCfL96	AS1669	1779	gUfgCfcuuUfcAfcagGfaA fuGfuUfusUfisa			
D1670	S1670	688	AfaCfaUfuCfcUfGfUfgAf aagGfcAfcUfL96	AS1670	1780	aGfuGfcCfUfUfuCfaCaGf gAfaUfgUfusUfisu			
D1671	S1671	689	AfaCfaUfuCfcUfGfUfgAf aAfgGfcAfcUfL96	AS1671	1781	aGfuGfccUfuCfaCaGfg AfaUfgUfusUfisu			
D1672	S1672	690	AfcAfuUfcCfuGfUfGfaAfa ggCfaCfuUfL96	AS1672	1782	aAfgUfgCfCfUfuUfcacAf gGfaAfuGfusUfisu			
D1673	S1673	691	AfcAfuUfcCfuGfUfGfaAfa GfGfCfaCfuUfL96	AS1673	1783	aAfgUfgccUfuUfcacAfgG faAfuGfusUfisu			
D1674	S1674	692	CfaUfuCfcUfgUfGfAfaAf ggcAfcUfuUfL96	AS1674	1784	aAfaGfuGfCfCfuUfucaCf aGfgAfaUfsgUfisu			
D1675	S1675	693	CfaUfuCfcUfgUfGfAfaAf gGfCfAfcUfuUfL96	AS1675	1785	aAfaGfugcCfuUfucaCfa GfgAfaUfsgUfisu			
D1676	S1676	694	AfuUfcCfuGfuGfAfaAfaGf gcaCfuUfuUfL96	AS1676	1786	aAfaAfgUfGfCfcUfuucAf cAfgGfaAfusGfsu			
D1677	S1677	695	AfuUfcCfuGfuGfAfaAfaGf gCfAfcUfuUfL96	AS1677	1787	aAfaAfgugCfcUfuucAfcA fgGfaAfusGfsu			
D1678	S1678	696	UfuCfcUfgUfgAfaAfaGfC acUfuUfuCfL96	AS1678	1788	gAfaAfaGfUfGfcCfuuuCf aCfaGfgAfasUfsg			
D1679	S1679	697	UfuCfcUfgUfgAfaAfaGfC AfCfUfuUfuCfL96	AS1679	1789	gAfaAfaGfCfcUfuuuCfa CfaGfgAfasUfsg			
D1680	S1680	698	UfcCfuGfuGfaAfaGfGfCf	AS1680	1790	uGfaAfaAfaGfUfgCfcuuUf			

D1681	S1681	699	acuUfuUfcAfl96	UfcCfuGfuCfaAfaGfgCf aCfUfuUfcAfl96	AS1681	1791	cAfcAfgGfasAfsu	uGfaAfaagUfgCfuuUfc AfcAfgGfasAfsu				
D1682	S1682	700	CfcUfgUfgAfaGfgCfcAfc uuUfuCfaUfl96	CfcUfgUfgAfaGfgCfcAfc UfuUfuCfaUfl96	AS1682	1792	aUfgAfaAfaGfuGfuccUf uCfaCfaGfgsAfsa	aUfgAfaAfaGfuGfuccUf uCfaCfaGfgsAfsa				
D1683	S1683	701	CfcUfgUfgAfaGfgCfcAfc UfuUfuCfaUfl96	CfcUfgUfgAfaGfgCfcAfc UfuUfuCfaUfl96	AS1683	1793	aUfgAfaaaGfuGfuccUfu CfaCfaGfgsAfsa	aUfgAfaaaGfuGfuccUfu CfaCfaGfgsAfsa				
D1684	S1684	702	CfuGfuGfaAfaGfgCfaCf uuuUfcAfuUfl96	CfuGfuGfaAfaGfgCfaCf uuuUfcAfuUfl96	AS1684	1794	aAfuGfaAfaAfgUfgccUf uUfcAfcAfgsGfsa	aAfuGfaAfaAfgUfgccUf uUfcAfcAfgsGfsa				
D1685	S1685	703	CfuGfuGfaAfaGfgCfaCf uUfuUfcAfuUfl96	CfuGfuGfaAfaGfgCfaCf uUfuUfcAfuUfl96	AS1685	1795	aAfuGfaaaaAfgUfgccUfu UfcAfcAfgsGfsa	aAfuGfaaaaAfgUfgccUfu UfcAfcAfgsGfsa				
D1686	S1686	704	UfgUfgAfaAfgGfcAfcUfu uuCfaUfuCfl96	UfgUfgAfaAfgGfcAfcUfu uuCfaUfuCfl96	AS1686	1796	gAfaUfgAfaAfaGfugcCf uUfuCfaCfasGfsg	gAfaUfgAfaAfaGfugcCf uUfuCfaCfasGfsg				
D1687	S1687	705	UfgUfgAfaAfgGfcAfcUfu UfuCfaUfuCfl96	UfgUfgAfaAfgGfcAfcUfu UfuCfaUfuCfl96	AS1687	1797	gAfaUfgaaAfaGfugcCfu UfuCfaCfasGfsg	gAfaUfgaaAfaGfugcCfu UfuCfaCfasGfsg				
D1688	S1688	706	GfuGfaAfaGfgCfaCfuUf uuCfaUfuCfl96	GfuGfaAfaGfgCfaCfuUf uuCfaUfuCfl96	AS1688	1798	gGfaAfuGfAfaAfgugCf cUfuUfcAfcAfsa	gGfaAfuGfAfaAfgugCf cUfuUfcAfcAfsa				
D1689	S1689	707	GfuGfaAfaGfgCfaCfuUf uUfcAfuUfcCfl96	GfuGfaAfaGfgCfaCfuUf uUfcAfuUfcCfl96	AS1689	1799	gGfaAfuagaAfaAfgugCfc UfuUfcAfcAfsa	gGfaAfuagaAfaAfgugCfc UfuUfcAfcAfsa				
D1690	S1690	708	UfgAfaAfgGfcAfcUfuUfu caUfuCfcAfl96	UfgAfaAfgGfcAfcUfuUfu caUfuCfcAfl96	AS1690	1800	uGfgAfaUfgAfaAfgugGf cCfuUfuCfasCfsa	uGfgAfaUfgAfaAfgugGf cCfuUfuCfasCfsa				
D1691	S1691	709	UfgAfaAfgGfcAfcUfuUfu CfaUfuCfcAfl96	UfgAfaAfgGfcAfcUfuUfu CfaUfuCfcAfl96	AS1691	1801	uGfgAfaugAfaAfgugGfc CfuUfuCfasCfsa	uGfgAfaugAfaAfgugGfc CfuUfuCfasCfsa				
D1692	S1692	710	GfaAfaGfgCfaCfuUfuUf cauUfcCfaCfl96	GfaAfaGfgCfaCfuUfuUf cauUfcCfaCfl96	AS1692	1802	gUfgGfaAfuUfgAfaAfaagUf gCfcUfuUfcsAfcsc	gUfgGfaAfuUfgAfaAfaagUf gCfcUfuUfcsAfcsc				

D1693	S1693	711	GfaAfaGfgCfaCfaUfuUfuUf cAfUfuUfcCfaCfl96	AS1693	1803	gUfgGfaauGfaAfaagUfg CfcUfuUfcsAfcsc			
D1694	S1694	712	AfaAfgGfcAfcUfuUfuUfuCfa uuCfcAfcUfl96	AS1694	1804	aGfuGfgAfAfUfgAfaaaGf uGfcCfuUfusCfisa			
D1695	S1695	713	AfaAfgGfcAfcUfuUfuUfuCfa UfuUfcAfcUfl96	AS1695	1805	aGfuGfgaaUfgAfaaaGfu GfcCfuUfusCfisa			
D1696	S1696	714	AfaGfgCfaCfuUfuUfuUfcAf uucCfaCfuUfl96	AS1696	1806	aAfgUfgGfAfAfUgfaaaAf gUfgCfcUfusUfsc			
D1697	S1697	715	AfaGfgCfaCfuUfuUfuUfcAf uUfcCfaCfuUfl96	AS1697	1807	aAfgUfggaAfUgfaaaAfg UfgCfcUfusUfsc			
D1698	S1698	716	AfgGfcAfcUfuUfuUfcAfUfu ccaAfcUfuUfl96	AS1698	1808	aAfaGfuGfGfAfAfUfgaaAf aGfuGfcCfusUfsc			
D1699	S1699	717	AfgGfcAfcUfuUfuUfcAfUfu CfcAfcUfuUfl96	AS1699	1809	aAfaGfuggAfaUfgaaAfa GfuGfcCfusUfsc			
D1700	S1700	718	GfgCfaCfuUfuUfcAfUfuUf ccaCfuUfuAfl96	AS1700	1810	uAfaAfgUfgGfAfAfugaAf aAfgUfgCfcsUfsc			
D1701	S1701	719	GfgCfaCfuUfuUfcAfUfuUf cCfAfCfuUfuAfl96	AS1701	1811	uAfaAfgugGfaAfugaAfaA fgUfgCfcsUfsc			
D1702	S1702	720	GfcAfcUfuUfuUfcAfUfuCfc acUfuUfaAfl96	AS1702	1812	uUfaAfaGfUfgGfAfAugAf aAfaGfuGfcsCfsc			
D1703	S1703	721	GfcAfcUfuUfuUfcAfUfuCfc AfCfuUfuUfaAfl96	AS1703	1813	uUfaAfaGuGfAfAugAfa AfaGfuGfcsCfsc			
D1704	S1704	722	CfaCfuUfuUfcAfUfuUfcCfa cuUfuAfaCfl96	AS1704	1814	gUfuAfaAfGfUfgGfaauGf aAfaAfgUfcsCfsc			
D1705	S1705	723	CfaCfuUfuUfcAfUfuUfcCfa	AS1705	1815	gUfuAfaagUfgGfaauGfa			

D1706	S1706	724	CfUfUfuAfaCfL96	AS1706	1816	AfaAfgUfgsCfsc				
D1707	S1707	725	AfcUfuUfuCfaUfuUfCfCfaCfcUuUfaAfcUfL96	AS1707	1817	aGfuUfaAfaUfGfuGfgaaUfgAfaAfaGfusGfsc				
D1708	S1708	726	AfcUfuUfuCfaUfuUfCfCfaCfcUfUfaAfcUfL96	AS1708	1818	aGfuUfaaaaGfuGfgaaUfgAfaAfaGfusGfsc				
D1709	S1709	727	CfuUfuUfcaFuUfCfCfaCfcUuuAfaCfuUfL96	AS1709	1819	aAfgUfuAfaUfGfuUfgaaAfuGfaAfaAfgsUfsg				
D1710	S1710	728	CfuUfuUfcaFuUfCfCfaCfcUfUfUfaAfaCfuUfL96	AS1710	1820	aAfgUfuuaaAfgUfgaaAfuGfaAfaAfgsUfsg				
D1711	S1711	729	UfuUfuCfaUfuCfCfaCfcUfUfAfaCfuUfuGfL96	AS1711	1821	cAfaGfuUfaAfaGfuggAfaUfgAfaAfasGfsu				
D1712	S1712	730	UfuUfcaFuUfCfCfaCfcUfUfaaCfuUfgAfL96	AS1712	1822	uCfaAfgUfuAfaAfgugGfaAfuGfaAfasAfsG				
D1713	S1713	731	UfuUfcaFuUfCfCfaCfcUfUfaAfaCfuUfgAfL96	AS1713	1823	uCfaAfguuAfaAfgugGfaAfuGfaAfasAfsG				
D1714	S1714	732	UfuCfaUfuCfcaCfCfuUfuUfaaacUfuGfaUfL96	AS1714	1824	aUfcAfaGfuUfaAfaAfaGfuGfaUfgAfasAfsa				
D1715	S1715	733	UfuCfaUfuCfcaCfCfuUfuUfaAfaCfuUfgaUfL96	AS1715	1825	aUfcAfaGfuUfaAfaAfaGfuGfaUfgAfasAfsa				
D1716	S1716	734	UfcaFuUfCfcaCfUfuUfaAfaacuUfgAfuUfL96	AS1716	1826	aAfuCfaAfaGfuUfaAfaaGfuGfaAfuGfasAfsa				
D1717	S1717	735	UfcaFuUfCfcaCfUfuUfaAfaCfuUfgAfuUfL96	AS1717	1827	aAfuCfaaGfuUfaAfaaGfuGfaAfuGfasAfsa				

D1718	S1718	736	CfaUfuCfcAfcUfuUfaAfcUuGfaUfuUfL96	AS1718	1828	aAfaUfcAfaUfGfuUfaaaGfuGfgAfaUfGsa			
D1719	S1719	737	CfaUfuCfcAfcUfuUfaAfcUfUfGfaUfuUfL96	AS1719	1829	aAfaUfcaaGfuUfaaaGfuGfgAfaUfGsa			
D1720	S1720	738	AfuUfcCfaCfuUfuUfaCfuUgAfuUfuUfL96	AS1720	1830	aAfaAfuCfaAfaUfuUfaaaAfgUfGfaAfuGsa			
D1721	S1721	739	AfuUfcCfaCfuUfuUfaCfuUfGfaUfuUfuUfL96	AS1721	1831	aAfaAfucaAfgUfuuaAfgUfGfaAfuGsa			
D1722	S1722	740	UfuCfcAfcUfuUfaAfcUfugaUfuUfuUfL96	AS1722	1832	aAfaAfaUfCfaAfaGfuuaAfaGfuGfgAfaUfGsa			
D1723	S1723	741	UfuCfcAfcUfuUfaAfcUfGfaUfuUfuUfL96	AS1723	1833	aAfaAfaucAfaGfuuaAfaGfuGfgAfaUfGsa			
D1724	S1724	742	UfcCfaCfuUfuUfaAfcUfgaUfuUfuUfL96	AS1724	1834	aAfaAfaAfuUfCfaAfguuAfaAfgUfGfgAfaUfGsa			
D1725	S1725	743	UfcCfaCfuUfuUfaAfcUfGfaUfuUfuUfL96	AS1725	1835	aAfaAfaauCfaAfguuAfaAfgUfGfgAfaUfGsa			
D1726	S1726	744	CfcAfcUfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfL96	AS1726	1836	uAfaAfaAfaUfCfaAfguUfaAfaGfuGfgAfaUfGsa			
D1727	S1727	745	CfcAfcUfuUfaAfcUfuGfaUfUfUfuUfaAfcUfuUfL96	AS1727	1837	uAfaAfaaaUfCfaAfguUfaAfaGfuGfgAfaUfGsa			
D1728	S1728	746	CfaCfuUfuAfaCfuUfGfaUfuUfuUfaAfcUfuUfL96	AS1728	1838	uUfaAfaAfaAfuCfaagUfuUfaAfgUfGfgAfaUfGsa			
D1729	S1729	747	CfaCfuUfuAfaCfuUfGfaUfUfUfuUfaAfcUfuUfL96	AS1729	1839	uUfaAfaaaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfgAfaUfGsa			
D1730	S1730	748	AfcUfuUfaAfcUfuUfGfaUfu	AS1730	1840	uUfuAfaAfaAfaUfcaaGf			

D1731	S1731	749	uuUfuAfaAflL96	AfcUfuUfaAfcUfUfGfaUfuUfuUfuAfaAflL96	AS1731	1841	uUfaAfaGfusGfsg					
D1732	S1732	750	CfuUfuAfaCfuUfGfAfuUfuuUfaAfaUflL96	CfuUfuAfaCfuUfGfAfuUfuuUfaAfaUflL96	AS1732	1842	aUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfaUfuAfaAfgsUfsg					
D1733	S1733	751	CfuUfuAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	CfuUfuAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1733	1843	aUfuUfaaaaAfaAfaAfaAfaUfuAfaAfgsUfsg					
D1734	S1734	752	UfuUfaAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfuUfaAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1734	1844	aAfuUfuAfaAfaAfaAfaAfaGfuUfaAfasGfsu					
D1735	S1735	753	UfuUfaAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfuUfaAfaCfuUfGfAfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1735	1845	aAfuUfuuaaAfaAfaAfaAfaGfuUfaAfasGfsu					
D1736	S1736	754	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1736	1846	gAfaUfuUfaAfaAfaAfaAfaaUfaAfgUfuAfasAfg					
D1737	S1737	755	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1737	1847	gAfaUfuuaAfaAfaAfaAfaAfaAfgUfuAfasAfg					
D1738	S1738	756	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1738	1848	gGifaAfuUfuUfaAfaAfaaaUfaAfaGfuUfasAfsa					
D1739	S1739	757	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1739	1849	gGifaAfuuuAfaAfaAfaAfaAfaAfaGfuUfasAfsa					
D1740	S1740	758	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1740	1850	gGigAfaUfuUfaAfaaaAfaUfaAfgUfusAfsa					
D1741	S1741	759	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1741	1851	gGigAfauuUfaAfaaaAfaUfaAfgUfusAfsa					
D1742	S1742	760	AfcUfuGfaUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AfcUfuGfaUfuUfuUfuUfaAfaUflL96	AS1742	1852	aGigGfaAfuUfuAfaaaAfaUfaAfaGfusUfsa					

D1743	S1743	761	AfcUfuGfaUfuUfuUfuAf aAfUfUfcCfcUfL96	AS1743	1853	aGfgGfaauUfuAfaaaAfa UfcAfaGfusUfsa			
D1744	S1744	762	CfuUfgAfuUfuUfuUfaAf auuCfcCfuUfL96	AS1744	1854	aAfgGfaAfUfuUfaaaAf aAfuCfaAfgsUfsu			
D1745	S1745	763	CfuUfgAfuUfuUfuUfaAf aUfUfCfcCfuUfL96	AS1745	1855	aAfgGfgaaUfuUfaaaAfa AfuCfaAfgsUfsu			
D1746	S1746	764	UfuGfaUfuUfuUfaAfaAf uuCfcUfuAfl96	AS1746	1856	uAfaGfgGfaAfUfuuaaAf aAfaUfcAfasGfsu			
D1747	S1747	765	UfuGfaUfuUfuUfaAfaAf uUfCfcCfuUfaUfL96	AS1747	1857	uAfaGfggaAfuUfuuaAfa AfaUfcAfasGfsu			
D1748	S1748	766	UfgAfuUfuUfaAfaUfu ccCfuUfaUfL96	AS1748	1858	aUfaAfgGfgAfaUfuuaAf aAfaAfuCfasAfsG			
D1749	S1749	767	UfgAfuUfuUfaAfaUfu CfCfcfuUfaUfL96	AS1749	1859	aUfaAfgggAfaUfuuaAfaA faAfuCfasAfsG			
D1750	S1750	768	GfaUfuUfuUfaAfaUfu ccUfuAfuUfL96	AS1750	1860	aAfuAfaGfgGfaAfuuuAf aAfaAfaUfcsAfsa			
D1751	S1751	769	GfaUfuUfuUfaAfaUfu CfCfuAfuUfL96	AS1751	1861	aAfuAfaaggGfaAfuuuAfaA faAfaUfcsAfsa			
D1752	S1752	770	AfuUfuUfuUfaAfaUfuCfc cuUfaUfuGfL96	AS1752	1862	cAfaUfaAfGfgAfaauUf aAfaAfaAfusCfsa			
D1753	S1753	771	AfuUfuUfuUfaAfaUfuCfc CfUfUfaUfuGfL96	AS1753	1863	cAfaUfaagGfgAfaauUfa AfaAfaAfusCfsa			
D1754	S1754	772	UfuUfuUfuAfaAfuUfCfc uuAfuUfgUfL96	AS1754	1864	aCfaAfuAfaGfgGfaauUf uAfaAfaAfasUfsc			
D1755	S1755	773	UfuUfuUfuAfaAfuUfCfc	AS1755	1865	aCfaAfuuaaGfgGfaauUfu			

D1756	S1756	774	UfuUfaUfuUfgUfL96	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfuGfuCfL96	AS1756	1866	AfaAfaAfasUfsc	gAfcAfaUfaAfaUfaUfgGfgaaUfuUfaAfaAfasAfsu				
D1757	S1757	775	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfaUfuGfuCfL96	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfaUfuGfuCfL96	AS1757	1867	AfaAfaAfasUfsc	gAfcAfaUfaAfaUfaUfgGfgaaUfuUfaAfaAfasAfsu				
D1758	S1758	776	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfgUfcCfL96	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuauUfgUfcCfL96	AS1758	1868	AfaAfaAfasUfsc	gGfaCfaAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfaAfaAfasAfsa				
D1759	S1759	777	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuAfUfUfgUfcCfL96	UfuUfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuAfUfUfgUfcCfL96	AS1759	1869	AfaAfaAfasUfsc	gGfaCfaauAfaGfgaaAfaUfuUfaAfaAfasAfsa				
D1760	S1760	778	UfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfuUfuGfuCfcCfL96	UfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfuUfuGfuCfcCfL96	AS1760	1870	AfaAfaAfasUfsc	gGfgAfcAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfaAfaAfasAfsa				
D1761	S1761	779	UfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfaUfuGfuCfcCfL96	UfuUfaAfaUfuUfcCfcCfuuUfaUfuGfuCfcCfL96	AS1761	1871	AfaAfaAfasUfsc	gGfgAfcAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfaAfaAfasAfsa				
D1762	S1762	780	UfuAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	UfuAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	AS1762	1872	AfaAfaAfasUfsc	aGfgGfaCfaAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfaAfasAfsa				
D1763	S1763	781	UfuAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	UfuAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	AS1763	1873	AfaAfaAfasUfsc	aGfgGfaCfaAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfaAfasAfsa				
D1764	S1764	782	UfaAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	UfaAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	AS1764	1874	AfaAfaAfasUfsc	aAfgGfgAfcAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfasAfsa				
D1765	S1765	783	UfaAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	UfaAfaUfuUfcCfcCfUfaUfuUfgUfcCfcUfL96	AS1765	1875	AfaAfaAfasUfsc	aAfgGfgAfcAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfasAfsa				
D1766	S1766	784	AfaAfuUfcCfcUfaAfuUfgUfcCfcUfL96	AfaAfuUfcCfcUfaAfuUfgUfcCfcUfL96	AS1766	1876	AfaAfaAfasUfsc	gAfaGfgGfaCfaAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfasAfsa				
D1767	S1767	785	AfaAfuUfcCfcUfaAfuUfgUfcCfcUfL96	AfaAfuUfcCfcUfaAfuUfgUfcCfcUfL96	AS1767	1877	AfaAfaAfasUfsc	gAfaGfgaaCfaAfaUfaAfaGfgaaAfaUfuUfasAfsa				

D1768	S1768	786	AfaUfuCfcCfuUfaUfUfuGf uccCfuUfcCfL96	AS1768	1878	gGfaAfgGfGfAfcAfaUaAf gGfgAfaUfusUfisa			
D1769	S1769	787	AfaUfuCfcCfuUfaUfUfuGf uCfCfCfuUfcCfL96	AS1769	1879	gGfaAfgggAfcAfaUaAfg GfgAfaUfusUfisa			
D1770	S1770	788	AfuUfcCfcUfuAfuUfUfgUfc ccUfuCfcAfl96	AS1770	1880	uGfgAfaGfGfGfaCfaUaAf aGfgGfaAfusUfisu			
D1771	S1771	789	AfuUfcCfcUfuAfuUfUfgUfc CfCfUfuCfcAfl96	AS1771	1881	uGfgAfaGgGfaCfaUaAfa GfgGfaAfusUfisu			
D1772	S1772	790	UfuCfcCfuUfaUfUfGfuCf ccuUfcCfaAfl96	AS1772	1882	uUfgGfaAfGfGfgAfcaUf aAfgGfgAfasUfisu			
D1773	S1773	791	UfuCfcCfuUfaUfUfGfuCf cCfUfUfcCfaAfl96	AS1773	1883	uUfgGfaagGfgAfcaUfa AfgGfgAfasUfisu			
D1774	S1774	792	UfcCfcUfuAfuUfGfUfcCfc uuCfcAfaAfl96	AS1774	1884	uUfuGfgAfaAfGfgGfacaAf uAfaGfgGfasAfsu			
D1775	S1775	793	UfcCfcUfuAfuUfGfUfcCfc UfUfcAfaAfl96	AS1775	1885	uUfuGfgaaGfgGfacaAfu AfaGfgGfasAfsu			
D1776	S1776	794	CfcCfuUfaUfuGfUfcCfcCf uucCfaAfaAfl96	AS1776	1886	uUfuUfgGfAfaGfgacAf aUfaAfgGfgsAfsa			
D1777	S1777	795	CfcCfuUfaUfuGfUfcCfcCf uUfcCfaAfaAfl96	AS1777	1887	uUfuUfggaAfgGfgacAfa UfaAfgGfgsAfsa			
D1778	S1778	796	CfcUfuAfuUfgUfcCfcUfu ccAfaAfaAfl96	AS1778	1888	uUfuUfuGfGfAfaGfggaCf aAfuAfaGfgsGfsa			
D1779	S1779	797	CfcUfuAfuUfgUfcCfcUfu CfCfAfaAfaAfl96	AS1779	1889	uUfuUfuggAfaGfggaCfa AfuAfaGfgsGfsa			
D1780	S1780	798	CfuUfaUfuGfuCfcCfuUf	AS1780	1890	uUfuUfuUfGfGfaAfgggAf			

D1781	S1781	799	ccaAfaAfaAflL96	CfuUfaUfuGfuCfcCfuUf cCfAfAfaAfaAflL96	AS1781	1891	cAfaUfaAfgsGfsg	uUfuUfuUgGfaAfgggAfc AfaUfaAfgsGfsg				
D1782	S1782	800	UfuAfuUfgUfcCfcUfuCfc aaAfaAfaAflL96	UfuAfuUfgUfcCfcUfuCfc aaAfaAfaAflL96	AS1782	1892	uUfuUfuUfuUfgAfggGf aCfaAfuAfasGfsg	uUfuUfuUfuUfgAfggGf aCfaAfuAfasGfsg				
D1783	S1783	801	UfuAfuUfgUfcCfcUfuCfc AfaAfaAfaAflL96	UfuAfuUfgUfcCfcUfuCfc AfaAfaAfaAflL96	AS1783	1893	uUfuUfuUfuUfgAfggGfa CfaAfuAfasGfsg	uUfuUfuUfuUfgAfggGfa CfaAfuAfasGfsg				
D1784	S1784	802	UfaUfuGfuCfcCfUfuCf aaaAfaAfaAflL96	UfaUfuGfuCfcCfUfuCf aaaAfaAfaAflL96	AS1784	1894	uUfuUfuUfuUfgGfaagGf gAfcAfaUfasAfsG	uUfuUfuUfuUfgGfaagGf gAfcAfaUfasAfsG				
D1785	S1785	803	UfaUfuGfuCfcCfUfuCf aAfaAfaAfaAflL96	UfaUfuGfuCfcCfUfuCf aAfaAfaAfaAflL96	AS1785	1895	uUfuUfuUfuUfgGfaagGfg AfcAfaUfasAfsG	uUfuUfuUfuUfgGfaagGfg AfcAfaUfasAfsG				
D1786	S1786	804	AfuUfgUfcCfcUfuCfcAfa aaAfaAfaGflL96	AfuUfgUfcCfcUfuCfcAfa aaAfaAfaGflL96	AS1786	1896	cUfuUfuUfuUfuGfgaaGf gGfaCfaAfasAfsa	cUfuUfuUfuUfuGfgaaGf gGfaCfaAfasAfsa				
D1787	S1787	805	AfuUfgUfcCfcUfuCfcAfa AfaAfaAfaAflL96	AfuUfgUfcCfcUfuCfcAfa AfaAfaAfaAflL96	AS1787	1897	cUfuUfuUfuUfuGfgaaGfg GfaCfaAfasAfsa	cUfuUfuUfuUfuGfgaaGfg GfaCfaAfasAfsa				
D1788	S1788	806	UfuGfuCfcCfuUfcCfaAf aaaAfaAfaAflL96	UfuGfuCfcCfuUfcCfaAf aaaAfaAfaAflL96	AS1788	1898	uCfuUfuUfuUfuUfggaaAf gGfgAfcAfasUfsa	uCfuUfuUfuUfuUfggaaAf gGfgAfcAfasUfsa				
D1789	S1789	807	UfuGfuCfcCfuUfcCfaAf aAfaAfaAfaAflL96	UfuGfuCfcCfuUfcCfaAf aAfaAfaAfaAflL96	AS1789	1899	uCfuUfuUfuUfuUfggaaAfg GfgAfcAfasUfsa	uCfuUfuUfuUfuUfggaaAfg GfgAfcAfasUfsa				
D1790	S1790	808	UfgUfcCfcUfuCfcAfaAfa aaAfaGfaGflL96	UfgUfcCfcUfuCfcAfaAfa aaAfaGfaGflL96	AS1790	1900	cUfcUfuUfuUfuUfuggAf aGfgGfaCfasAfsu	cUfcUfuUfuUfuUfuggAf aGfgGfaCfasAfsu				
D1791	S1791	809	UfgUfcCfcUfuCfcAfaAfa AfaAfaGfaGflL96	UfgUfcCfcUfuCfcAfaAfa AfaAfaGfaGflL96	AS1791	1901	cUfcUfuUfuUfuUfuggAfa GfgGfaCfasAfsu	cUfcUfuUfuUfuUfuggAfa GfgGfaCfasAfsu				
D1792	S1792	810	GfuCfcCfuUfcCfaAfaAfa aaAfgAfgAflL96	GfuCfcCfuUfcCfaAfaAfa aaAfgAfgAflL96	AS1792	1902	uCfuCfuUfuUfuUfuugGf aAfgGfgAfcAfsa	uCfuCfuUfuUfuUfuugGf aAfgGfgAfcAfsa				

D1806	S1806	824	AfAtUfcAfaAflL96	CfcAfaAfaAfaAfGfAfaGfa auCfaAfaAflL96	AS1806	1916	UfuUfgGfasAfsG	uUfuUfgAfuUfcUfcuuUf uUfuUfuGfGfsAfsa				
D1807	S1807	825	AfAtUfcAfaAflL96	CfcAfaAfaAfaAfGfAfaGfa AfUfCfaAfaAflL96	AS1807	1917	UfuUfgauUfcUfcuuUfu	UfuUfuGfGfsAfsa				
D1808	S1808	826	AfAtUfcAfaAflL96	CfaAfaAfaAfaAfGfAfa ucAfaAfaUflL96	AS1808	1918	aUfuUfugaUfuCfucuUfu	uUfuUfuUfGfsGfsa				
D1809	S1809	827	AfAtUfcAfaAflL96	CfaAfaAfaAfaAfGfAfa UfCfaAfaAflL96	AS1809	1919	aUfuUfugaUfuCfucuUfu	UfuUfuUfGfsGfsa				
D1810	S1810	828	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaAfu caAfaAfuUflL96	AS1810	1920	aAfuUfuUfGfAfuUfcucUf	uUfuUfuUfusGfsg				
D1811	S1811	829	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaAfu CfaAfaAfuUflL96	AS1811	1921	aAfuUfuUfGfAfuUfcucUfuU	fuUfuUfusGfsg				
D1812	S1812	830	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc aaAfaUfuUflL96	AS1812	1922	aAfaUfuUfuUfGfaUfcucCf	uUfuUfuUfusUfsg				
D1813	S1813	831	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc AfaAfaUfuUflL96	AS1813	1923	aAfaUfuUfuUfGfaUfcucCfu	UfuUfuUfusUfsg				
D1814	S1814	832	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc aaAfuUfuUflL96	AS1814	1924	aAfaAfuUfuUfUfgAfuucUf	cUfuUfuUfusUfssu				
D1815	S1815	833	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc AfaAfaUfuUflL96	AS1815	1925	aAfaAfuUfuUfUfgAfuucUfcU	fuUfuUfusUfssu				
D1816	S1816	834	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc aaUfuUfuUflL96	AS1816	1926	uAfaAfaUfuUfuGfaucCf	uCfuUfuUfusUfssu				
D1817	S1817	835	AfAtUfcAfaAflL96	AfaAfaAfaAfaGfAfaUfc AfaAfaUfuUflL96	AS1817	1927	uAfaAfaUfuUfuGfaucCfu	CfuUfuUfusUfssu				

D1818	S1818	836	AfaAfaGfaGfaAfaUfCfaAfaaUfuUfaCfl96	AS1818	1928	gUfaAfaAfaUfuUfgauUfcUfuUfusUfsu			
D1819	S1819	837	AfaAfaGfaGfaAfaUfCfaAfaUfuUfaCfl96	AS1819	1929	gUfaAfaaUfuUfgauUfcUfuUfusUfsu			
D1820	S1820	838	AfaAfgAfaAfaUfCfaAfaUuUfaAfaAfl96	AS1820	1930	uGfuAfaAfaUfuUfugaUfcUfuUfusUfsu			
D1821	S1821	839	AfaAfgAfaAfaUfCfaAfaUfuUfaAfaAfl96	AS1821	1931	uGfuAfaaaUfuUfugaUfuCfuCfuUfusUfsu			
D1822	S1822	840	AfaGfaGfaAfaUfCfaAfaUuUfaCfaAfl96	AS1822	1932	uUfgUfaAfaAfaUfuugAfaUfcUfcUfusUfsu			
D1823	S1823	841	AfaGfaGfaAfaUfCfaAfaUfuUfaCfaAfl96	AS1823	1933	uUfgUfaaaAfaUfuugAfaUfcUfcUfusUfsu			
D1824	S1824	842	AfgAfgAfaUfcAfaAfaUfuUfaAfaAfl96	AS1824	1934	uUfuGfuAfaAfaUfuuuGfaUfuCfuCfusUfsu			
D1825	S1825	843	AfgAfgAfaUfcAfaAfaUfuUfaAfaAfl96	AS1825	1935	uUfuGfuuaAfaUfuuuGfaUfuCfuCfusUfsu			
D1826	S1826	844	GfaGfaAfaUfCfaAfaUfuUfaAfaGfl96	AS1826	1936	cUfuUfgUfaAfaAfaUfuUfgAfaUfcUfcsUfsu			
D1827	S1827	845	GfaGfaAfaUfCfaAfaUfuUfaAfaGfl96	AS1827	1937	cUfuUfguaAfaAfaUfuUfgAfaUfcUfcsUfsu			
D1828	S1828	846	AfgAfaUfcAfaAfaUfuUfaAfaAfgAfl96	AS1828	1938	uCfuUfuGfUfaAfaUfuUfgAfaUfuCfusCfus			
D1829	S1829	847	AfgAfaUfcAfaAfaUfuUfaAfaAfgAfl96	AS1829	1939	uCfuUfuguAfaAfaUfuUfgAfaUfuCfusCfus			
D1830	S1830	848	GfaAfaUfCfaAfaUfuUfuUf	AS1830	1940	uUfcUfuUfgUfaAfaaUf			

D1831	S1831	849	acaAfaGfaAfl96	GfaAfuCfaAfaAfuUfuUf aCfaAfaCfaAfl96	AS1831	1941	uUfgAfuUfcsUfsc	uUfcUfuugUfaAfaaaUfu UfgAfuUfcsUfsc				
D1832	S1832	850	AfaUfcAfaAfaUfuUfuAfc aaAfgAfaUfl96	AfaUfcAfaAfaUfuUfuAfc AfaAfgAfaUfl96	AS1832	1942	aUfuCfuUfuUfgUfaaaaUf uUfuGfaUfusCfsu	aUfuCfuUfuUfgUfaaaaUf uUfuGfaUfusCfsu				
D1833	S1833	851	AfaUfcAfaAfaUfuUfuAfc AfaAfgAfaUfl96	AfaUfcAfaAfaUfuUfuAfc AfaAfgAfaUfl96	AS1833	1943	aUfuCfuuuGfuAfaaaaUfu UfuGfaUfusCfsu	aUfuCfuuuGfuAfaaaaUfu UfuGfaUfusCfsu				
D1834	S1834	852	AfuCfaAfaAfuUfuUfaCfa aaGfaAfuCfl96	AfuCfaAfaAfuUfuUfaCfa aaGfaAfuCfl96	AS1834	1944	gAfuUfcUfuUfgUfaaaaAf uUfuUfgAfusUfsc	gAfuUfcUfuUfgUfaaaaAf uUfuUfgAfusUfsc				
D1835	S1835	853	AfuCfaAfaAfuUfuUfaCfa AfaGfaAfuCfl96	AfuCfaAfaAfuUfuUfaCfa AfaGfaAfuCfl96	AS1835	1945	gAfuUfcuuUfgUfaaaaAfu UfuUfgAfusUfsc	gAfuUfcuuUfgUfaaaaAfu UfuUfgAfusUfsc				
D1836	S1836	854	UfcAfaAfaUfuUfuUfaCfa agAfaUfcAfl96	UfcAfaAfaUfuUfuUfaCfa agAfaUfcAfl96	AS1836	1946	uGfaUfuCfuUfuGfuuaaAf aUfuUfuGfasUfsu	uGfaUfuCfuUfuGfuuaaAf aUfuUfuGfasUfsu				
D1837	S1837	855	UfcAfaAfaUfuUfuUfaCfa AfgAfaUfcAfl96	UfcAfaAfaUfuUfuUfaCfa AfgAfaUfcAfl96	AS1837	1947	uGfaUfucuUfuGfuuaAfa UfuUfuGfasUfsu	uGfaUfucuUfuGfuuaAfa UfuUfuGfasUfsu				
D1838	S1838	856	CfaAfaAfuUfuUfaCfaAfa gaAfuCfaAfl96	CfaAfaAfuUfuUfaCfaAfa gaAfuCfaAfl96	AS1838	1948	uUfgAfuUfcUfuUfguaAf aAfuUfuUfgsAfsu	uUfgAfuUfcUfuUfguaAf aAfuUfuUfgsAfsu				
D1839	S1839	857	CfaAfaAfuUfuUfaCfaAfa GfaAfuCfaAfl96	CfaAfaAfuUfuUfaCfaAfa GfaAfuCfaAfl96	AS1839	1949	uUfgAfuucUfuUfguaAfaA fuUfuUfgsAfsu	uUfgAfuucUfuUfguaAfaA fuUfuUfgsAfsu				
D1840	S1840	858	AfaAfaUfuUfuUfaCfaAfaAfg aaUfcAfaAfl96	AfaAfaUfuUfuUfaCfaAfaAfg aaUfcAfaAfl96	AS1840	1950	uUfuGfaUfuUfcUfuUfguaAf aAfaUfuUfusGfsa	uUfuGfaUfuUfcUfuUfguaAf aAfaUfuUfusGfsa				
D1841	S1841	859	AfaAfaUfuUfuUfaCfaAfaAfg AfaUfcAfaAfl96	AfaAfaUfuUfuUfaCfaAfaAfg AfaUfcAfaAfl96	AS1841	1951	uUfuGfauuCfuUfuguAfa AfaUfuUfusGfsa	uUfuGfauuCfuUfuguAfa AfaUfuUfusGfsa				
D1842	S1842	860	AfaAfuUfuUfaCfaAfaGfa auCfaAfaGfl96	AfaAfuUfuUfaCfaAfaGfa auCfaAfaGfl96	AS1842	1952	cUfuUfgAfuUfuUfcUfuugUf aAfaAfuUfusUfsg	cUfuUfgAfuUfuUfcUfuugUf aAfaAfuUfusUfsg				

D1843	S1843	861	AfaAfuUfuUfaCfaAfaGfaAfuCfaAfaGfL96	AS1843	1953	cUfuUfgauUfcUfuugUfaAfaAfuUfusUfsg				
D1844	S1844	862	AfaUfuUfuAfcAfaAfgAfaAfaAfgGfL96	AS1844	1954	cCfuUfuGfaUfuCfuuuGfuAfaAfaUfusUfsu				
D1845	S1845	863	AfaUfuUfuAfcAfaAfgAfaUfcAfaAfgGfL96	AS1845	1955	cCfuUfugaUfuCfuuuGfuAfaAfaUfusUfsu				
D1846	S1846	864	AfuUfuUfaCfaAfaAfgAfaAfaAfaGfL96	AS1846	1956	uCfcUfuUfgAfaUfcuuUfgUfaAfaAfaUfusUfsu				
D1847	S1847	865	AfuUfuUfaCfaAfaAfgAfaAfaAfaGfL96	AS1847	1957	uCfcUfuugAfuUfcuuUfgUfaAfaAfaUfusUfsu				
D1848	S1848	866	UfuUfuAfcAfaAfgAfaUfcAfaAfgGfL96	AS1848	1958	uUfcCfuUfuUfgAfaUfcuuUfgUfaAfaAfaUfusUfsu				
D1849	S1849	867	UfuUfuAfcAfaAfgAfaUfcAfaAfgGfL96	AS1849	1959	uUfcCfuuuGfaUfcuuUfuGfuAfaAfaUfusUfsu				
D1850	S1850	868	UfuUfaCfaAfaGfaAfaUfcAfaAfgGfL96	AS1850	1960	aUfuCfcUfuUfgAfaUfcuuUfgUfaAfaAfaUfusUfsu				
D1851	S1851	869	UfuUfaCfaAfaGfaAfaUfcAfaAfgGfL96	AS1851	1961	aUfuCfcuuUfgAfaUfcuuUfgUfaAfaAfaUfusUfsu				
D1852	S1852	870	UfuAfcAfaAfgAfaUfcAfaAfaAfaUfcL96	AS1852	1962	aAfuUfcCfuUfuUfgAfaUfcuuUfuGfuAfaAfaUfusUfsu				
D1853	S1853	871	UfuAfcAfaAfgAfaUfcAfaAfaAfaUfcL96	AS1853	1963	aAfuUfcuuUfuGfaUfcuuUfuGfuAfaAfaUfusUfsu				
D1854	S1854	872	UfaCfaAfaGfaAfaUfcAfaAfaAfaUfcL96	AS1854	1964	gAfaUfuCfcUfuUfgauUfcuuUfuUfgUfasAfa				
D1855	S1855	873	UfaCfaAfaGfaAfaUfcAfaAfaAfaUfcL96	AS1855	1965	gAfaUfuccUfuUfgauUfcuuUfuUfgUfasAfa				

D1856	S1856	874	aGfGfAfaUfuCflL96	AS1856	1966	fuUfgUfasAfsa				
D1857	S1857	875	AfaAfaAfaUfuCfaAfaAfg gaAfuUfcUflL96	AS1857	1967	aGfaAfuUfcCfuUfugaUf uCfuUfuGfusAfsa				
D1858	S1858	876	AfaAfaAfaUfuCfaAfaAfg GfaAfaUfuUflL96	AS1858	1968	aGfaAfuUfcCfuUfugaUfu CfuUfuGfusAfsa				
D1859	S1859	877	CfaAfaGfaAfuCfaAfaGf gaaUfuCfuAflL96	AS1859	1969	uAfgAfaUfuCfuUfugaUfu uUfcUfuUfcsUfsa				
D1860	S1860	878	CfaAfaGfaAfuCfaAfaGf gAfaUfuCfuAflL96	AS1860	1970	uAfgAfaUfuCfuUfugaUfu fcUfuUfcsUfsa				
D1861	S1861	879	AfaAfaAfaUfuCfaAfaAfgGfa auUfcUfaGflL96	AS1861	1971	cUfaGfaAfuUfcCfuUfuGf aUfuCfuUfusGfsu				
D1862	S1862	880	AfaAfaAfaUfuCfaAfaAfgGfa AfuUfcUfaGflL96	AS1862	1972	cUfaGfaAfuUfcCfuUfuGfa UfuCfuUfusGfsu				
D1863	S1863	881	AfaGfaAfuCfaAfaAfgGfa UfuCfuAfgAflL96	AS1863	1973	uCfuAfgAfaUfuCfuUfuGf gAfuUfcUfusUfsg				
D1864	S1864	882	AfaGfaAfuCfaAfaAfgGfaAfu ucUfaGfaAflL96	AS1864	1974	uCfuAfgaaUfuCfuUfuGf AfuUfcUfusUfsg				
D1865	S1865	883	AfgAfaUfuCfaAfaAfgGfaAfu UfcUfaGfaAflL96	AS1865	1975	uUfcUfaGfaAfaUfuCfuUfuGf uGfaUfuCfusUfsu				
D1866	S1866	884	GfaAfuCfaAfaGfaAfaUfu ucuAfgAfaAflL96	AS1866	1976	uUfuCfuAfaGfaAfaUfuCfuUfuGf uUfgAfuUfcsUfsu				
D1867	S1867	885	GfaAfuCfaAfaGfaAfaUfu uCfuAfgAfaAflL96	AS1867	1977	uUfuCfuagAfaUfuCfuUfuGf UfgAfuUfcsUfsu				

D1868	S1868	886	AfaUfcAfaAigGfAfaUfc uaGfaAfaGfL96	AS1868	1978	cUfuUfcUfAfgAfaUfuucCf uUfuGfaUfusCfsu			
D1869	S1869	887	AfaUfcAfaAigGfAfaUfc UfAfgAfaAfaGfL96	AS1869	1979	cUfuUfcuaGfaAfuucCfu UfuGfaUfusCfsu			
D1870	S1870	888	AfuCfaAfaGigAfaUfuCfu agAfaAfgUfL96	AS1870	1980	aCfuUfuCfuUfAfgAfaUfuCf cUfuUfgAfaUfusCfsu			
D1871	S1871	889	AfuCfaAfaGigAfaUfuCfu AfgAfaAfaGfUfL96	AS1871	1981	aCfuUfcuAfgAfaUfuCfuU fuUfgAfaUfusCfsu			
D1872	S1872	890	UfcAfaAigGfaAfuUfcUfa gaAfaGfuAfaL96	AS1872	1982	uAfcUfuUfcUfaGfaUfuCf cCfuUfuGfasUfus			
D1873	S1873	891	UfcAfaAigGfaAfuUfcUfa GfaAfaGfuAfaL96	AS1873	1983	uAfcUfuucUfaGfaUfuCf CfuUfuGfasUfus			
D1874	S1874	892	CfaAfaGigAfaUfuCfuAfa gaaAfgUfaUfL96	AS1874	1984	aUfaCfuUfuUfcUfaAfgaaUf uCfcUfuUfgsAfsu			
D1875	S1875	893	CfaAfaGigAfaUfuCfuAfa gfaAfaGfuAfaUfL96	AS1875	1985	aUfaCfuuuCfuAfgaaUfu CfcUfuUfgsAfsu			
D1876	S1876	894	AfaAfgGfaAfuUfcUfaGf aaaGfuAfuCfL96	AS1876	1986	gAfuAfcUfuUfcUfagaAf uUfcCfuUfusGfsa			
D1877	S1877	895	AfaAfgGfaAfuUfcUfaGf aAfaGfuAfuCfL96	AS1877	1987	gAfuAfcuuUfcUfagaAfuU fcCfuUfusGfsa			
D1878	S1878	896	AfaGigAfaUfuCfuAfaAfa agUfaUfcUfL96	AS1878	1988	aGfaUfaCfuUfuCfuagAf aUfuCfcUfusUfsg			
D1879	S1879	897	AfaGigAfaUfuCfuAfaAfa AfgUfaUfcUfL96	AS1879	1989	aGfaUfacuUfuCfuagAfa UfuCfcUfusUfsg			
D1880	S1880	898	AfgGfaAfuUfcUfaGfaAfa	AS1880	1990	cAfgAfuAfcUfuUfcuaGf			

D1881	S1881	899	guAfuCfuGfL96	AfgGfaAfuUfcUfaGfaAfaGfUfaAfuCfuGfL96	AS1881	1991	aAfuUfcCfusUfsu	cAfgAfuacUfuUfcuaGfaAfuUfcCfusUfsu				
D1882	S1882	900	GfgAfaUfuCfuAfgAfaAfguaUfcUfgGfL96	GfgAfaUfuCfuAfgAfaAfguaUfcUfgGfL96	AS1882	1992	cCfaGfaUfaCfuUfucuAfgAfaUfuCfcsUfsu	cCfaGfaUfaCfuUfucuAfgAfaUfuCfcsUfsu				
D1883	S1883	901	GfgAfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	GfgAfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	AS1883	1993	cCfaGfauaCfuUfucuAfgAfaUfuCfcsUfsu	cCfaGfauaCfuUfucuAfgAfaUfuCfcsUfsu				
D1884	S1884	902	GfaAfuUfcUfaGfaAfaGfuaUfcUfgGfL96	GfaAfuUfcUfaGfaAfaGfuaUfcUfgGfL96	AS1884	1994	cCfcAfgAfuAfcUfuucUfaGfaAfuUfcsCfsc	cCfcAfgAfuAfcUfuucUfaGfaAfuUfcsCfsc				
D1885	S1885	903	GfaAfuUfcUfaGfaAfaGfuaUfcUfgGfL96	GfaAfuUfcUfaGfaAfaGfuaUfcUfgGfL96	AS1885	1995	cCfcAfgauAfcUfuucUfaGfaAfuUfcsCfsc	cCfcAfgauAfcUfuucUfaGfaAfuUfcsCfsc				
D1886	S1886	904	AfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	AfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	AS1886	1996	gCfcCfaGfaAfaCfuuuCfuAfgAfaUfusCfsc	gCfcCfaGfaAfaCfuuuCfuAfgAfaUfusCfsc				
D1887	S1887	905	AfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	AfaUfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfL96	AS1887	1997	gCfcCfagaUfaCfuuuCfuAfgAfaUfusCfsc	gCfcCfagaUfaCfuuuCfuAfgAfaUfusCfsc				
D1888	S1888	906	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuCuGfgGfcAflL96	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuCuGfgGfcAflL96	AS1888	1998	uGfcCfcAfgAfaAfcuuUfcUfaGfaAfusUfsc	uGfcCfcAfgAfaAfcuuUfcUfaGfaAfusUfsc				
D1889	S1889	907	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuCfUfgGfgGfcAflL96	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuCfUfgGfgGfcAflL96	AS1889	1999	uGfcCfcagAfuAfcuuUfcUfaGfaAfusUfsc	uGfcCfcagAfuAfcuuUfcUfaGfaAfusUfsc				
D1890	S1890	908	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfgCfaGfL96	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfgCfaGfL96	AS1890	2000	cUfgCfcCfaGfaUfacuUfcUfcUfaAfgAfasUfsu	cUfgCfcCfaGfaUfacuUfcUfcUfaAfgAfasUfsu				
D1891	S1891	909	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfgCfaGfL96	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfgCfaGfL96	AS1891	2001	cUfgCfccaGfaUfacuUfcUfaAfgAfasUfsu	cUfgCfccaGfaUfacuUfcUfaAfgAfasUfsu				
D1892	S1892	910	UfcUfaGfaAfaGfUfaUfcUfgGfcAfgAflL96	UfcUfaGfaAfaGfUfaUfcUfgGfcAfgAflL96	AS1892	2002	uCfuGfcCfcAfgAfuacUfcUfcUfaGfasAfsu	uCfuGfcCfcAfgAfuacUfcUfcUfaGfasAfsu				

D1893	S1893	911	UfcUfaGfaAfaGfUfAfuCf uGfGfGfcAfgAflL96	AS1893	2003	uCfuGfcccAfgAfuacUfuU fcUfaGfasAfsu			
D1894	S1894	912	CfuAfgAfaAfgUfAfuCfuGf ggCfaGfaAflL96	AS1894	2004	uUfcUfgCfCfCfaGfauaCf uUfuCfuAfgsAfsa			
D1895	S1895	913	CfuAfgAfaAfgUfAfuCfuGf GfGfCfaGfaAflL96	AS1895	2005	uUfcUfgccCfaGfauaCfu UfuCfuAfgsAfsa			
D1896	S1896	914	UfaGfaAfaGfuAfuCfuGf ggcAfgAfaCflL96	AS1896	2006	gUfuCfuGfCfCfAfgauAf cUfuUfcUfasGfsa			
D1897	S1897	915	UfaGfaAfaGfuAfuCfuGf gGfCfAfgAfaCflL96	AS1897	2007	gUfuCfugcCfCfAfgauAfcU fuUfcUfasGfsa			
D1898	S1898	916	AfgAfaAfgUfaUfCfuGfGf gcaGfaAfcGflL96	AS1898	2008	cGfuUfcUfGfCfCfagaUf aCfuUfuCfusAfsG			
D1899	S1899	917	AfgAfaAfgUfaUfCfuGfGf gCfAfgAfaCfGflL96	AS1899	2009	cGfuUfcugCfCfCfagaUfa CfuUfuCfusAfsG			
D1900	S1900	918	GfaAfaGfuAfuCfuGfGfGf cagAfaCfGcflL96	AS1900	2010	gCfG UfuCfuUfGfCfCagAf uAfcUfuUfcsUfsa			
D1901	S1901	919	GfaAfaGfuAfuCfuGfGfGf cAfGfAfaCfGcflL96	AS1901	2011	gCfG UfucuGfCfCagAfuA fcUfuUfcsUfsa			
D1902	S1902	920	AfaAfgUfaUfcUfGfGfGfCf agaAfcGfcUflL96	AS1902	2012	aGfcGfuUfCfUfgCfccaGf aUfaCfuUfusCfsu			
D1903	S1903	921	AfaAfgUfaUfcUfGfGfGfCf aGfAfaCfGcUflL96	AS1903	2013	aGfcGfuucUfgCfccaGfa UfaCfuUfusCfsu			
D1904	S1904	922	AfaGfuAfuCfuGfGfGfCfAfc gaaCfGcFuAflL96	AS1904	2014	uAfgCfG UfuCfuGfcccAf gAfuAfcUfusUfsc			
D1905	S1905	923	AfaGfuAfuCfuGfGfGfCfAfc	AS1905	2015	uAfgCfGuuUfuGfcccAfgA			

D1906	S1906	924	gAfAfCfGcCfuAfL96	AS1906	2016	fuAfCufUfsc			
D1907	S1907	925	AfgUfaUfcUfgGfCfCfaGf aacGfcUfaGfL96	AS1907	2017	cUfaGfcGfUfUfcUfgccCf aGfaUfaCfusUfsu			
D1908	S1908	926	AfgUfaUfcUfgGfCfCfaGf aAfCfGfcUfaGfL96	AS1908	2018	cUfaGfcguUfcUfgccCfa GfaUfaCfusUfsu			
D1909	S1909	927	GfuAfuCfuGfgGfCfAfGfAf acgCfuAfGfL96	AS1909	2019	cCfuAfGcGfUfuCfugcCf cAfGafuAfcsUfsu			
D1910	S1910	928	GfuAfuCfuGfgGfCfAfGfAf aCfGfCfuAfGfL96	AS1910	2020	cCfuAfGcgUfuCfugcCfCfA fgAfuAfcsUfsu			
D1911	S1911	929	UfaUfcUfgGfgCfAfGfaAf cgcUfaGfGfL96	AS1911	2021	uCfcUfagcGfuUfcugCfCf CfaGfaUfasCfsu			
D1912	S1912	930	UfaUfcUfgGfgCfAfGfAfCf gcuAfGfGfaGfL96	AS1912	2022	cUfcCfuAfGfCfGfUfucuGf cCfcAfGafusAfsc			
D1913	S1913	931	AfuCfuGfgGfCfAfGfAfCf gCfUfAfGfGfaGfL96	AS1913	2023	cUfcCfuagCfGfUfucuGfCf CfCfAfGafusAfsc			
D1914	S1914	932	UfcUfgGfgCfaGfAfAfCfGf cuaGfGfAfGfL96	AS1914	2024	uCfuCfcUfAfGfCfGfucuUf gCfcCfaGfasUfSa			
D1915	S1915	933	UfcUfgGfgCfaGfAfAfCfGf cUfAfGfGfAfGfL96	AS1915	2025	uCfuCfcuaGfCfGfucuUfGf CfCfCfaGfasUfSa			
D1916	S1916	934	CfuGfgGfcAfGfAfCfGfCf uagGfaGfaGfL96	AS1916	2026	cUfcUfcCfuAfGfCfGfucuCf uGfcCfCfAfGfAfsu			
D1917	S1917	935	CfuGfgGfcAfGfAfCfGfCf uAfGfGfaGfaGfL96	AS1917	2027	cUfcUfcuAfGfCfGfucuCfuGf fcCfCfAfGfAfsu			

D1918	S1918	936	UfgGfgCfaGfaAfcGfcUf aggAfgAfl96	AS1918	2028	uCfuCfuCfCfUfaGfcguUf cUfgCfcCfasGfsa			
D1919	S1919	937	UfgGfgCfaGfaAfcGfcUf aGfGfAfgAfl96	AS1919	2029	uCfuCfuuccUfaGfcguUfc UfgCfcCfasGfsa			
D1920	S1920	938	GfgGfcAfgAfaCfGfCfuAf ggaGfaGfaUfl96	AS1920	2030	aUfcUfcUfcCfuAfgcgUf uCfuGfcCfasAfsf			
D1921	S1921	939	GfgGfcAfgAfaCfGfCfuAf gGfAfgAfaUfl96	AS1921	2031	aUfcUfcucCfuAfgcgUfuC fuGfcCfasAfsf			
D1922	S1922	940	GfgCfaGfaAfcGfcUfaGf gagAfgAfuCfl96	AS1922	2032	gAfuCfuCfuCfuCfuAfgcGf uUfcUfgCfasCfsa			
D1923	S1923	941	GfgCfaGfaAfcGfcUfaGf gAfgAfgAfuCfl96	AS1923	2033	gAfuCfucuCfuAfgcGfu UfcUfgCfasCfsa			
D1924	S1924	942	GfcAfgAfaCfGfCfuAfgGf agaGfaUfcCfl96	AS1924	2034	gGfaUfcUfcUfcCfuagCf gUfuCfuGfasCfsc			
D1925	S1925	943	GfcAfgAfaCfGfCfuAfgGf aGfAfgAfuCfl96	AS1925	2035	gGfaUfcucUfcCfuagCf UfuCfuGfasCfsc			
D1926	S1926	944	CfaGfaAfcGfcUfaGfAfgAf gagAfuCfcAfl96	AS1926	2036	uGfgAfuCfuCfuCfuaGf cGfuUfcUfscCfsc			
D1927	S1927	945	CfaGfaAfcGfcUfaGfAfgAf gAfgAfuCfcAfl96	AS1927	2037	uGfgAfuCfuCfuaGfC GfuUfcUfscCfsc			
D1928	S1928	946	AfgAfaCfGfCfuAfgGfAfgAf agaUfcCfaAfl96	AS1928	2038	uUfgGfaUfcUfcUfcUfcUf gCfGfUfuCfusGfsc			
D1929	S1929	947	AfgAfaCfGfCfuAfgGfAfgAf aGfAfuCfaAfl96	AS1929	2039	uUfgGfaucUfcUfcUfcUfC fgUfuCfusGfsc			
D1930	S1930	948	GfaAfcGfcUfaGfAfgAf	AS1930	2040	uUfuGfgAfuCfuCfuCfuCf uUfcUfcUfcUfcUfcUf			

D1931	S1931	949	gauCfcAfaAflL96	GfaAfcGfcUfaGfGfAfgAf gAfUfcfcAfaAflL96	AS1931	2041	aGfcGfuUfcsUfsg	uUfuGfgauCfuCfuuccUfa CfcGfuUfcsUfsg				
D1932	S1932	950	AfaCfGcUfaGfAfgAfaUfL96	AfaCfGcUfaGfAfgAfaUfL96	AS1932	2042	aUfuUfgGfAfuUfcUfcucCf uAfgCfGfuUfcsUfsg	aUfuUfgGfAfuUfcUfcucCf uAfgCfGfuUfcsUfsg				
D1933	S1933	951	AfaCfGcUfaGfAfgAfaUfL96	AfaCfGcUfaGfAfgAfaUfL96	AS1933	2043	aUfuUfgGfAfuUfcUfcucCf fgCfGfuUfcsUfsg	aUfuUfgGfAfuUfcUfcucCf fgCfGfuUfcsUfsg				
D1934	S1934	952	AfcGfcUfaGfAfgAfaUfL96	AfcGfcUfaGfAfgAfaUfL96	AS1934	2044	aAfuUfuGfGfAfuCfuucCf cUfaGfcGfusUfsc	aAfuUfuGfGfAfuCfuucCf cUfaGfcGfusUfsc				
D1935	S1935	953	AfcGfcUfaGfAfgAfaUfL96	AfcGfcUfaGfAfgAfaUfL96	AS1935	2045	aAfuUfuggAfuCfuucCf faGfcGfusUfsc	aAfuUfuggAfuCfuucCf faGfcGfusUfsc				
D1936	S1936	954	CfgCfuAfgGfaGfAfaUfL96	CfgCfuAfgGfaGfAfaUfL96	AS1936	2046	aAfaUfuUfGfGfaUfcucUf cCfuAfgCfGfusUfsg	aAfaUfuUfGfGfaUfcucUf cCfuAfgCfGfusUfsg				
D1937	S1937	955	CfgCfuAfgGfaGfAfaUfL96	CfgCfuAfgGfaGfAfaUfL96	AS1937	2047	aAfaUfuUfGfGfaUfcucUf CfuAfgCfGfusUfsg	aAfaUfuUfGfGfaUfcucUf CfuAfgCfGfusUfsg				
D1938	S1938	956	GfcUfaGfGfAfgAfaUfL96	GfcUfaGfGfAfgAfaUfL96	AS1938	2048	gAfaAfuUfUfGfGfaUfcucCf uCfcUfaGfcsGfsg	gAfaAfuUfUfGfGfaUfcucCf uCfcUfaGfcsGfsg				
D1939	S1939	957	GfcUfaGfGfAfgAfaUfL96	GfcUfaGfGfAfgAfaUfL96	AS1939	2049	gAfaAfuUfUfGfGfaUfcucCf CfcUfaGfcsGfsg	gAfaAfuUfUfGfGfaUfcucCf CfcUfaGfcsGfsg				
D1940	S1940	958	CfuAfgGfaGfAfaUfL96	CfuAfgGfaGfAfaUfL96	AS1940	2050	gGfaAfaUfuUfGfGfaucUf cUfcCfuAfgsCfsg	gGfaAfaUfuUfGfGfaucUf cUfcCfuAfgsCfsg				
D1941	S1941	959	CfuAfgGfaGfAfaUfL96	CfuAfgGfaGfAfaUfL96	AS1941	2051	gGfaAfaUfuUfGfGfaucUf UfcCfuAfgsCfsg	gGfaAfaUfuUfGfGfaucUf UfcCfuAfgsCfsg				
D1942	S1942	960	UfaGfGfAfgAfaUfL96	UfaGfGfAfgAfaUfL96	AS1942	2052	uGfGfAfaUfuUfGfGfaucUf uCfuCfcUfasGfsc	uGfGfAfaUfuUfGfGfaucUf uCfuCfcUfasGfsc				

D1943	S1943	961	UfaGfgAfgAfuUfCfcAfa AfuUfuCfcAfl96	AS1943	2053	uGfgAfaauUfuGfgauCfu CfuCfcUfasGfsc			
D1944	S1944	962	AfgGfaGfaGfaUfCfcAfa auuUfcCfaUfl96	AS1944	2054	aUfgGfaAfaUfuUfggaUf cUfcUfcCfusAfsf			
D1945	S1945	963	AfgGfaGfaGfaUfCfcAfa aUfUfCfcAfaUfl96	AS1945	2055	aUfgGfaaaUfuUfggaUfc UfcUfcCfusAfsf			
D1946	S1946	964	GfgAfgAfuCfcAfaAfa uuCfcAfuUfl96	AS1946	2056	aAfuGfgAfaAfaUfuggAf uCfuCfuCfcsUfsc			
D1947	S1947	965	GfgAfgAfuCfcAfaAfa UfUfCfcAfuUfl96	AS1947	2057	aAfuGfgaaAfuUfuggAfu CfuCfuCfcsUfsc			
D1948	S1948	966	GfaGfaGfaUfcCfaAfaUf uucCfaUfuGfl96	AS1948	2058	cAfaUfgGfaAfaUfuugGf aUfcUfcUfcsCfsu			
D1949	S1949	967	GfaGfaGfaUfcCfaAfaUf uUfCfcAfuUfuGfl96	AS1949	2059	cAfaUfggaAfaUfuugGfa UfcUfcUfcsCfsu			
D1950	S1950	968	AfgAfgAfuCfcAfaAfaUfu ccAfuUfgUfl96	AS1950	2060	aCfaAfuGfgAfaAfuuuGf gAfuCfuCfusCfsc			
D1951	S1951	969	AfgAfgAfuCfcAfaAfaUfu CfcAfuUfgUfl96	AS1951	2061	aCfaAfuuggAfaAfuuuGfg AfuCfuCfusCfsc			
D1952	S1952	970	GfaGfaUfcCfaAfaUfuUf ccaUfuGfuCfl96	AS1952	2062	gAfcAfaUfGfgAfaauUf gGfaUfcUfcsUfsc			
D1953	S1953	971	GfaGfaUfcCfaAfaUfuUf cCfaUfuGfuCfl96	AS1953	2063	gAfcAfaugGfaAfaauUfg GfaUfcUfcsUfsc			
D1954	S1954	972	AfgAfuCfcAfaAfaUfuCfc auUfgUfcUfl96	AS1954	2064	aGfaCfaAfuUfgGfaAfaauUf uGfgAfuCfusCfsu			
D1955	S1955	973	AfgAfuCfcAfaAfaUfuCfc	AS1955	2065	aGfaCfaauGfgAfaauUfu			

D1956	S1956	974	AfuUfgUfcUfL96	GfaUfcCfaAfaUfUfCfCfaUfcCfaUfcCfaUfcUfL96	AS1956	2066	GfgAfuCfusCfsu	aAfgAfcAfaUfUfgGfaaaaUfUfgGfaUfcsUfsc				
D1957	S1957	975	AfuUfgUfcUfL96	GfaUfcCfaAfaUfUfCfCfaUfcCfaUfcCfaUfcUfL96	AS1957	2067	GfgAfuCfusCfsu	aAfgAfcAfaUfUfgGfaaaaUfUfgGfaUfcsUfsc				
D1958	S1958	976	AfuUfgUfcUfL96	AfuCfcAfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1958	2068	GfgAfuCfusCfsu	cAfaGfaCfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1959	S1959	977	AfuUfgUfcUfL96	AfuCfcAfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1959	2069	GfgAfuCfusCfsu	cAfaGfaCfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1960	S1960	978	AfuUfgUfcUfL96	UfcCfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1960	2070	GfgAfuCfusCfsu	gCfaAfgAfcAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1961	S1961	979	AfuUfgUfcUfL96	UfcCfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1961	2071	GfgAfuCfusCfsu	gCfaAfgAfcAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1962	S1962	980	AfuUfgUfcUfL96	CfcAfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1962	2072	GfgAfuCfusCfsu	uGfcAfaGfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1963	S1963	981	AfuUfgUfcUfL96	CfcAfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1963	2073	GfgAfuCfusCfsu	uGfcAfaGfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1964	S1964	982	AfuUfgUfcUfL96	CfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1964	2074	GfgAfuCfusCfsu	uUfgCfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1965	S1965	983	AfuUfgUfcUfL96	CfaAfaUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1965	2075	GfgAfuCfusCfsu	uUfgCfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1966	S1966	984	AfuUfgUfcUfL96	AfaAfuUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1966	2076	GfgAfuCfusCfsu	cUfuGfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				
D1967	S1967	985	AfuUfgUfcUfL96	AfaAfuUfUfCfCfaUfcUfcUfcUfL96	AS1967	2077	GfgAfuCfusCfsu	cUfuGfaAfaUfUfgGfaaaaUfUfcUfcUfcUfL96				

D1968	S1968	986	AfaUfuUfcCfaUfuUfGfuCf uugCfaAfgCfL96	AS1968	2078	gCfuUfgCfAfaAfgAfcAaUf gGfaAfaUfusUfsg			
D1969	S1969	987	AfaUfuUfcCfaUfuUfGfuCf uUfGfCfaAfgCfL96	AS1969	2079	gCfuUfgcaAfgAfcAaUfg GfaAfaUfusUfsg			
D1970	S1970	988	AfuUfuCfcAfuUfGfUfcUfu gcAfaGfcAfl96	AS1970	2080	uGfcUfuGfCfAfaGfacaAf uGfgAfaAfusUfsu			
D1971	S1971	989	AfuUfuCfcAfuUfGfUfcUfu GfCfAfaGfcAfl96	AS1971	2081	uGfcUfugcAfaGfacaAfu GfgAfaAfusUfsu			
D1972	S1972	990	UfuUfcCfaUfuUfGfUfcUfu gcaAfgCfaAfl96	AS1972	2082	uUfgCfuUfGfCfaAfgacAf aUfgGfaAfasUfsu			
D1973	S1973	991	UfuUfcCfaUfuUfGfUfcUfu gCfAfaAfgCfaAfl96	AS1973	2083	uUfgCfuugCfaAfgacAfa UfgGfaAfasUfsu			
D1974	S1974	992	UfuCfcAfuUfgUfcUfuGf caaGfcAfaAfl96	AS1974	2084	uUfuGfcUfuUfgCfaAfgaCf aAfuGfgAfasUfsu			
D1975	S1975	993	UfuCfcAfuUfgUfcUfuGf cAfaAfgCfaAfl96	AS1975	2085	uUfuGfcuuGfcAfgaCfa AfuGfgAfasUfsu			
D1976	S1976	994	UfcCfaUfuGfuCfUfUfgCf aagCfaAfaGfl96	AS1976	2086	cUfuUfgCfUfUfgCfaagAf cAfaUfgGfasAfsa			
D1977	S1977	995	UfcCfaUfuGfuCfUfUfgCf aAfgCfaAfaGfl96	AS1977	2087	cUfuUfgcuUfgCfaagAfcA faUfgGfasAfsa			
D1978	S1978	996	CfcAfuUfgUfcUfUfGfcAfa gcAfaAfgCfL96	AS1978	2088	gCfuUfuGfCfUfuGfcaaGf aCfaAfuGfgsAfsa			
D1979	S1979	997	CfcAfuUfgUfcUfUfGfcAfa GfCfAfaAfgCfL96	AS1979	2089	gCfuUfugcUfuGfcaaGfa CfaAfuGfgsAfsa			
D1980	S1980	998	CfaUfuGfuCfuUfGfCfaAf	AS1980	2090	uGfcUfuUfGfCfuUfgcaAf			

D1981	S1981	999	gcaAfaGfcAfL96	CfaUfuGfcUfuUfgCfAfaAf gCfAfaGfcAfL96	AS1981	2091	gAfcAfaUfgsGfsa			
D1982	S1982	1000	AfuUfgUfcUfuGfcAfaGf caaAfgCfaCfL96	AfuUfgUfcUfuGfcAfaGf cAfaAfgCfaCfL96	AS1982	2092	gUfgCfuUfuUfgCfuUfgcAf aGfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1983	S1983	1001	AfuUfgUfcUfuGfcAfaGf cAfaAfgCfaCfL96	AfuUfgUfcUfuGfcAfaGf cAfaAfgCfaCfL96	AS1983	2093	gUfgCfuUfuUfgCfuUfgcAfa GfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1984	S1984	1002	UfuGfcUfuUfgCfaAfaGfCf aaaGfcAfaCfL96	UfuGfcUfuUfgCfaAfaGfCf aaaGfcAfaCfL96	AS1984	2094	cGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfuUfgCf aAfgAfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1985	S1985	1003	UfuGfcUfuUfgCfaAfaGfCf aAfaAfgCfaCfL96	UfuGfcUfuUfgCfaAfaGfCf aAfaAfgCfaCfL96	AS1985	2095	cGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfuUfgCfa AfgAfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1986	S1986	1004	UfgUfcUfuGfcAfaGfcAfa agCfaCfUfL96	UfgUfcUfuGfcAfaGfcAfa agCfaCfUfL96	AS1986	2096	aCfgUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfuUfgCf cAfaGfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1987	S1987	1005	UfgUfcUfuGfcAfaGfcAfa AfGfcCfaCfUfL96	UfgUfcUfuGfcAfaGfcAfa AfGfcCfaCfUfL96	AS1987	2097	aCfgUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfuUfgCf AfaGfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1988	S1988	1006	GfuCfuUfgCfaAfaGfcAfaAf agcAfaCfUfL96	GfuCfuUfgCfaAfaGfcAfaAf agcAfaCfUfL96	AS1988	2098	uAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfuUfgCf gCfaAfgAfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1989	S1989	1007	GfuCfuUfgCfaAfaGfcAfaAf aGfcAfaCfUfL96	GfuCfuUfgCfaAfaGfcAfaAf aGfcAfaCfUfL96	AS1989	2099	uAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfuUfgCf CfaAfgAfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1990	S1990	1008	UfcUfuGfcAfaGfcAfaAfaGf caCfUfaUfL96	UfcUfuGfcAfaGfcAfaAfaGf caCfUfaUfL96	AS1990	2100	aUfaCfUfgUfgCfuUfgCfuUfgCfuUfgCf uGfcAfaGfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1991	S1991	1009	UfcUfuGfcAfaGfcAfaAfaGf CfaCfUfaUfL96	UfcUfuGfcAfaGfcAfaAfaGf CfaCfUfaUfL96	AS1991	2101	aUfaCfUfgUfgCfuUfgCfuUfgCfuUfgCf GfcAfaGfaCfaAfaUfgsGfsa			
D1992	S1992	1010	CfuUfgCfaAfaGfcAfaAfaGfc acGfuAfuUfL96	CfuUfgCfaAfaGfcAfaAfaGfc acGfuAfuUfL96	AS1992	2102	aAfuAfaCfUfgUfgCfuUfgCfuUfgCfuUfgCf uUfgCfaAfaGfaCfaAfaUfgsGfsa			

D1993	S1993	1011	CfuUfgCfaAfgCfAfaAfaGfc AfcGfuAfuUfL96	AS1993	2103	aAfuAfcguGfcUfuugCfu UfgCfaAfgsAfcsc			
D1994	S1994	1012	UfuGfcAfaGfcAfaAfaGfc cgUfaUfuAfl96	AS1994	2104	uAfaUfaCfGfUfgCfuuuGf cUfuGfcAfasGfisa			
D1995	S1995	1013	UfuGfcAfaGfcAfaAfaGfc CfGfuUfaUfuAfl96	AS1995	2105	uAfaUfacgUfgCfuuuGfc UfuGfcAfasGfisa			
D1996	S1996	1014	UfgCfaAfgCfaAfaAfaGfc guAfuUfaAfl96	AS1996	2106	uUfaAfuAfcGfuGfcuuUf gCfuUfgCfasAfcsg			
D1997	S1997	1015	UfgCfaAfgCfaAfaAfaGfc GfuAfuUfaAfl96	AS1997	2107	uUfaAfuacGfuGfcuuUfg CfuUfgCfasAfcsg			
D1998	S1998	1016	GfcAfaGfcAfaAfaAfaGfc guaUfuAfaAfl96	AS1998	2108	uUfuAfaUfaAfcGfuUfgcuUf uGfcUfuGfcsAfsa			
D1999	S1999	1017	GfcAfaGfcAfaAfaAfaGfc gUfaUfuAfaAfl96	AS1999	2109	uUfuAfauaCfuUfgcuUfu GfcUfuGfcsAfsa			
D2000	S2000	1018	CfaAfgCfaAfaGfcAfaGfc uuUfaAfaUfL96	AS2000	2110	aUfuUfaAfaAfcGfuGfcUf uUfgCfuUfgsCfisa			
D2001	S2001	1019	CfaAfgCfaAfaGfcAfaGfc uAfuUfaAfaUfL96	AS2001	2111	aUfuUfaauAfcGfuGfcUfu UfgCfuUfgsCfisa			
D2002	S2002	1020	AfaGfcAfaAfgCfaAfaGfc uuAfaAfuAfl96	AS2002	2112	uAfuUfaAfaUfaCfuugCf uUfuGfcUfusGfisc			
D2003	S2003	1021	AfaGfcAfaAfgCfaAfaGfc UfuAfaAfuAfl96	AS2003	2113	uAfuUfaaaUfaCfuugCfu UfuGfcUfusGfisc			
D2004	S2004	1022	AfgCfaAfaGfcAfaAfaGfc uaAfaUfaUfL96	AS2004	2114	aUfaUfuUfaAfaAfcguGf cUfuUfgCfusUfcsg			
D2005	S2005	1023	AfgCfaAfaGfcAfaAfaGfc AfuAfuAfuAfuAfuAfu	AS2005	2115	aUfaUfuuaAfuAfcguGfc			

D2006	S2006	1024	UfaAfaUfaUfL96	AS2006	2116	UfuUfgCfiusUfsg				
D2007	S2007	1025	GfcAfaAfgCfaCfGfUfaUf uaaAfuAfuGfL96	AS2007	2117	cAfuAfuUfuUfaUfaUfacgUf gCfuUfuGfcsUfsu				
D2008	S2008	1026	GfcAfaAfgCfaCfGfUfaUf uAfaAfaUfaUfaGfL96	AS2008	2118	cAfuAfuuuAfaUfacgUfgC fuUfuGfcsUfsu				
D2009	S2009	1027	CfaAfaGfcAfcGfUfAfuUfa aaUfaUfgAflL96	AS2009	2119	uCfaUfaUfuUfaAfuacGf uGfcUfuUfGfcsUfsu				
D2010	S2010	1028	CfaAfaGfcAfcGfUfAfuUfa AfaUfaUfgAflL96	AS2010	2120	uCfaUfauuUfaAfuacGfu GfcUfuUfGfcsUfsu				
D2011	S2011	1029	AfaAfgCfaCfgUfAfuUfaAfa auAfuGfaUfL96	AS2011	2121	aUfcAfuAfuUfaAfaaaCf gUfgCfuUfusGfsc				
D2012	S2012	1030	AfaAfgCfaCfgUfAfuUfaAfa AfUfaUfaUfgAflL96	AS2012	2122	aUfcAfuuuUfaAfaaaCfg UfgCfuUfusGfsc				
D2013	S2013	1031	AfaGfcAfcGfuAfuUfaAfa uaUfgAfuCfL96	AS2013	2123	gAfuCfaUfaUfaUfaaaAf cGfuGfcUfusUfsg				
D2014	S2014	1032	AfaGfcAfcGfuAfuUfaAfa UfaUfgAfuCfL96	AS2014	2124	gAfuCfaaaUfuUfaaaAf GfuGfcUfusUfsg				
D2015	S2015	1033	AfgCfaCfgUfaUfUfaAfaAfu auGfaUfcUfL96	AS2015	2125	aGfaUfcAfuUfaaaUf aCfgUfgCfiusUfsu				
D2016	S2016	1034	AfgCfaCfgUfaUfUfaAfaAfu AfUfgAfuUfcUfL96	AS2016	2126	aGfaUfcauAfuUfaaaUfa CfgUfgCfiusUfsu				
D2017	S2017	1035	GfcAfcGfuAfuUfaAfaUfa UfgAfuCfuGfL96	AS2017	2127	cAfgAfuCfaUfaUfaaaAf uAfcGfuGfcsUfsu				

D2031	S2031	1049	caGfcCfaUfL96	UfuAfaAfuAfuGfAfUfcUfgCfAfGfcCfaUfL96	AS2031	2141	uAfuUfuAfasUfSa				
D2032	S2032	1050	UfaAfaUfaUfgAfuAfuCfuGfcagCfcAfuUfL96	UfaAfaUfaUfgAfuAfuCfuGfcagCfcAfuUfL96	AS2032	2142	aAfuGfgCfUfGfcAfgauCfaUfaUfuUfasAfsu				
D2033	S2033	1051	UfaAfaUfaUfgAfuAfuCfuGfcAfGfcCfaUfL96	UfaAfaUfaUfgAfuAfuCfuGfcAfGfcCfaUfL96	AS2033	2143	aAfuGfgcuGfcAfgauCfaUfaUfuUfasAfsu				
D2034	S2034	1052	AfaAfuAfuGfaUfCfuUfgCfagcCfaUfuAfl96	AfaAfuAfuGfaUfCfuUfgCfagcCfaUfuAfl96	AS2034	2144	uAfaUfgGfcUfgCfagaUfcAfaUfuUfusAfsa				
D2035	S2035	1053	AfaAfuAfuGfaUfCfuUfgCfaGfcCfaUfuAfl96	AfaAfuAfuGfaUfCfuUfgCfaGfcCfaUfuAfl96	AS2035	2145	uAfaUfggcuUfgCfagaUfcAfaUfuUfusAfsa				
D2036	S2036	1054	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgccAfuUfaAfl96	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgccAfuUfaAfl96	AS2036	2146	uUfaAfuGfGfcUfgcagAfuCfaUfaUfusUfSa				
D2037	S2037	1055	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgCfCfaUfuUfaAfl96	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgCfCfaUfuUfaAfl96	AS2037	2147	uUfaAfuGfcUfgcagAfuCfaUfaUfusUfSa				
D2038	S2038	1056	AfuAfuGfaUfcUfgCfAfgccaUfuAfaAfl96	AfuAfuGfaUfcUfgCfAfgccaUfuAfaAfl96	AS2038	2148	uUfuAfaUfGfGfcUfgcaGfaUfcAfuAfasUfSu				
D2039	S2039	1057	AfuAfuGfaUfcUfgCfAfgccCfaUfuAfaAfl96	AfuAfuGfaUfcUfgCfAfgccCfaUfuAfaAfl96	AS2039	2149	uUfuAfaugGfcUfgcaGfaUfcAfuAfasUfSu				
D2040	S2040	1058	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfcauUfaAfaAfl96	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfcauUfaAfaAfl96	AS2040	2150	uUfuUfaAfuUfgGfgCfugcAfgAfuCfaUfasUfSu				
D2041	S2041	1059	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfcAfUfuAfaAfl96	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfcAfUfuAfaAfl96	AS2041	2151	uUfuUfaauGfgCfugcAfgAfuCfaUfasUfSu				
D2042	S2042	1060	AfuGfaUfCfuGfcAfgCfcauuAfaAfaAfl96	AfuGfaUfCfuGfcAfgCfcauuAfaAfaAfl96	AS2042	2152	uUfuUfaAfuUfgGfgCfugcCfaGfaUfcAfasUfSu				

D2043	S2043	1061	AfuGfaUfUfgCfaGfcCfaUfUfaAfaAfl96	AS2043	2153	uUfuUfuuaUfgGfcugCfaGfaUfcAfusAfsu			
D2044	S2044	1062	UfgAfuCfuGfcAfgCfaGfcAfuuaAfaAfaGfl96	AS2044	2154	cUfuUfuUfaAfuGfgcuGfcAfgAfuCfasUfsa			
D2045	S2045	1063	UfgAfuCfuGfcAfgCfaGfcAfuUfaAfaAfaGfl96	AS2045	2155	cUfuUfuuaAfuGfgcuGfcAfgAfuCfasUfsa			
D2046	S2046	1064	GfaUfcUfgCfaGfcCfaUfuuaaAfaAfgAfl96	AS2046	2156	uCfuUfuUfaAfaUfggcUfgCfaGfaUfcsAfsu			
D2047	S2047	1065	GfaUfcUfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfgAfl96	AS2047	2157	uCfuUfuuuAfaUfggcUfgCfaGfaUfcsAfsu			
D2048	S2048	1066	AfuCfuGfcAfgCfaGfcAfuUfaaaAfaGfaCfl96	AS2048	2158	gUfcUfuUfuUfaAfuuggCfuGfcAfgAfusCfsa			
D2049	S2049	1067	AfuCfuGfcAfgCfaGfcAfuUfaAfaAfaGfaCfl96	AS2049	2159	gUfcUfuuuUfaAfuuggCfuGfcAfgAfusCfsa			
D2050	S2050	1068	UfcUfgCfaGfcCfaUfuAfaaaAfgAfcAfl96	AS2050	2160	uGfuCfuUfuUfaAfaugGfcUfgCfaGfasUfsc			
D2051	S2051	1069	UfcUfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaAfgAfcAfl96	AS2051	2161	uGfuCfuuuUfuAfaugGfcUfgCfaGfasUfsc			
D2052	S2052	1070	CfuGfcAfgCfaUfuUfaAfaaaGfaCfaCfl96	AS2052	2162	gUfgUfcUfuUfuUfaauGfcCfuGfcAfgsAfsu			
D2053	S2053	1071	CfuGfcAfgCfaUfuUfaAfaAfaGfaCfaCfl96	AS2053	2163	gUfgUfcuuUfuUfaauGfcCfuGfcAfgsAfsu			
D2054	S2054	1072	UfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaaagAfcAfcAfl96	AS2054	2164	uGfuGfuCfuUfuUfuuaUfgGfcUfgCfasGfsa			
D2055	S2055	1073	UfgCfaGfcCfaUfuAfaAfa	AS2055	2165	uGfuGfucuUfuUfuuaUfg			

D2056	S2056	1074	aAfGfAfcAfL96	AS2056	2166	GfcUfgCfasGfsa				
D2057	S2057	1075	GfcAfgCfcAfuUfAfAfaAfaGaCfaCfaUfL96	AS2057	2167	aUfgUfgUfcUfuUfuuaAf uGfgCfuGfcsAfsG				
D2058	S2058	1076	GfcAfgCfcAfuUfAfAfaAfaGfAfCfaCfaUfL96	AS2058	2168	aUfgUfgucUfuUfuuaAfu GfgCfuGfcsAfsG				
D2059	S2059	1077	CfaGfcCfaUfuAfAfaAfaAfg acAfcAfuUfL96	AS2059	2169	aAfuGfuGfUfCfuUfuuuAf aUfgGfcUfGcsCfsa				
D2060	S2060	1078	CfaGfcCfaUfuAfAfaAfaAfg AfCfaAfuUfL96	AS2060	2170	aAfuGfuguCfuUfuuuAfa UfgGfcUfGcsCfsa				
D2061	S2061	1079	AfgCfcAfuUfaAfAfaAfaGfa caCfaUfuCfL96	AS2061	2171	gAfaUfgUfgUfcUfuuuUf aAfuGfgCfusGfsc				
D2062	S2062	1080	AfgCfcAfuUfaAfAfaAfaGfa CfaCfaUfuCfL96	AS2062	2172	gAfaUfgugUfcUfuuuUfa AfuGfgCfusGfsc				
D2063	S2063	1081	GfcCfaUfuAfaAfAfaAfgAfc acAfuUfcUfL96	AS2063	2173	aGfaAfuGfUfGfuCfuuuUf uAfaUfgGfcsUfsg				
D2064	S2064	1082	GfcCfaUfuAfaAfAfaAfgAfc AfCfaUfuUfL96	AS2064	2174	aGfaAfuGfuCfuuuUfu AfaUfgGfcsUfsg				
D2065	S2065	1083	CfcAfuUfaAfaAfAfaAfgAfc caUfuCfuGfL96	AS2065	2175	cAfgAfaUfGfUfgUfcuuUf uUfaAfuGfcsCfsu				
D2066	S2066	1084	CfcAfuUfaAfaAfAfaAfgAfc CfaUfuCfuGfL96	AS2066	2176	cAfgAfaugUfgUfcuuUfuU faAfuGfcsCfsu				
D2067	S2067	1085	CfaUfuAfaAfaAfAfaAfgAfc AfUfUfcUfgUfL96	AS2067	2177	aCfaGfaAfuUfGfuGfucuuUf uUfuAfaUfGcsGfsc				

D2068	S2068	1086	AfuUfaAfaAfaGfaCfaCfaCfaUuCfuGfuAflL96	AS2068	2178	uAfcAfgAfaUfgUfgucUfuUfuUfaAfaUfusGfsg			
D2069	S2069	1087	AfuUfaAfaAfaGfaCfaCfaUfUfCfuGfuAflL96	AS2069	2179	uAfcAfgaaUfgUfgucUfuUfuUfaAfaUfusGfsg			
D2070	S2070	1088	UfuAfaAfaAfgAfcAfaUfuUfgUfaAflL96	AS2070	2180	uUfaCfaGfaAfaUfuGfuguCfuUfuUfaAfaUfusGfsg			
D2071	S2071	1089	UfuAfaAfaAfgAfcAfaUfuUfCfuGfuUfaAflL96	AS2071	2181	uUfaCfaGfaAfaUfuGfuguCfuUfuUfaAfaUfusGfsg			
D2072	S2072	1090	UfaAfaAfaGfaCfaCfaUfucuGfuAfaAflL96	AS2072	2182	uUfuAfcAfgAfaUfgugUfcUfuUfuUfaUfusAfsu			
D2073	S2073	1091	UfaAfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfGfuAfaAflL96	AS2073	2183	uUfuAfcagAfaUfgugUfcUfuUfuUfaUfusAfsu			
D2074	S2074	1092	AfaAfaAfgAfcAfaUfuUfgUfaAfaAflL96	AS2074	2184	uUfuUfaCfaAfaUfuGfuUfcUfuUfaUfusAfsa			
D2075	S2075	1093	AfaAfaAfgAfcAfaUfuUfgUfaAfaAflL96	AS2075	2185	uUfuUfacaGfaAfaUfuGfuCfuUfuUfusAfsa			
D2076	S2076	1094	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuguAfaAfaAflL96	AS2076	2186	uUfuUfuAfcAfaUfgAfaugUfgUfcUfuUfusUfsa			
D2077	S2077	1095	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuGfuAfaAfaAflL96	AS2077	2187	uUfuUfuacAfgAfaugUfgUfcUfuUfusUfsa			
D2078	S2078	1096	AfaAfgAfcAfaUfuUfuUfaAfaAflL96	AS2078	2188	uUfuUfuUfaAfaCfaGfaaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2079	S2079	1097	AfaAfgAfcAfaUfuUfuUfaAfaAfaAflL96	AS2079	2189	uUfuUfuuaCfaGfaaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2080	S2080	1098	AfaGfaCfaCfaUfuUfuUfuGfu	AS2080	2190	uUfuUfuUfuUfaAfaGfaaUf			

D2081	S2081	1099	uaaAfaAfaAfl96	AS2081	2191	gUfgUfcUfusUfsu			
D2082	S2082	1100	AfaGfaCfaCfaUfCfuGf uAfaAfaAfaAfl96	AS2082	2192	uUfuUfuuuAfcAfgaaUfg UfgUfcUfusUfsu			
D2083	S2083	1101	AfgAfcAfcAfuUfCfuUfgUfa aaAfaAfaAfl96	AS2083	2193	uUfuUfuUfuUfaCfagaAf uGfuGfuCfusUfsu			
D2084	S2084	1102	AfgAfcAfcAfuUfCfuUfgUfa AfaAfaAfaAfl96	AS2084	2194	uUfuUfuuuUfaCfagaAfu GfuGfuCfusUfsu			
D2085	S2085	1103	GfaCfaCfaUfuCfuGfuAf aaaAfaAfaAfl96	AS2085	2195	uUfuUfuUfuUfuAfcagAf aUfgUfgUfcsUfsu			
D2086	S2086	1104	GfaCfaCfaUfuCfuGfuAf aAfaAfaAfaAfl96	AS2086	2196	uUfuUfuuuUfuAfcagAfa UfgUfgUfcsUfsu			
D2087	S2087	1105	AfcAfcAfuUfcUfGfuAfa aaAfaAfaAfl96	AS2087	2197	uUfuUfuUfuUfacaGf aAfuGfuGfusCfsu			
D2088	S2088	1106	AfcAfcAfuUfcUfGfuAfa AfaAfaAfaAfl96	AS2088	2198	uUfuUfuUfuUfuUfuacAf gAfaUfgUfcsUfsc			
D2089	S2089	1107	CfaCfaUfuCfuGfuAfaAf aaaAfaAfaAfl96	AS2089	2199	uUfuUfuUfuUfuUfuacAf AfaUfgUfcsUfsc			
D2090	S2090	1108	CfaCfaUfuCfuGfuAfaAf aAfaAfaAfaAfl96	AS2090	2200	uUfuUfuUfuUfuUfuuaCf aGfaAfuGfusGfsu			
D2091	S2091	1109	AfcAfuUfcUfgUfaAfaAfa AfaAfaAfaAfl96	AS2091	2201	uUfuUfuuuUfuUfuuaCfa GfaAfuGfusGfsu			

Los nucleótidos en minúscula (a, u, g, c) son nucleótidos de 2'-O-metilo; Nf (por ejemplo, Af) es un nucleótido 2'-fluoro; s es una conexión de fosforotriato; L96 indica un ligando de GalNAc3.

Ejemplo 4: Detección in vitro de agentes de iARNCultivo celular y transfecciones

Se cultivaron células Hep3B humanas o células H.II.4.E de rata (ATCC, Manassas, VA) casi hasta la confluencia a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en RPMI (ATCC) complementado con 10% de FBS, estreptomina y glutamina (ATCC) antes de liberarse de la placa por tripsinización. La transfección se llevó a cabo agregando 14.8ml de Opti-MEM más 0.2 ml de Lipofectamina RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat. No. 13778-150) hasta 5ml de dúplex de ARNip por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. 80 µl de medios de cultivo completos sin antibióticos que contenían ~2 x10⁴ células Hep3B se agregaron luego a la mezcla de ARNip. Las células se incubaron durante 24 o 120 horas antes de la purificación del ARN. Se realizaron experimentos de una sola dosis a 10nM y 0.1nM de concentración de dúplex final y se llevaron a cabo experimentos de respuesta a dosis usando diluciones en serie de 8, 4 veces con una dosis máxima de 10nM de concentración de dúplex final.

Aislamiento de ARN total usando el Kit de Aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen, parte No.: 610-12):

Las células se cultivaron y se lisaron en 150ml de Lisis/Tampón de Unión y luego se mezclaron durante 5 minutos a 850rpm usando un Termomixer Eppendorf® (la velocidad de mezclado fue la misma a lo largo de todo el proceso). Diez microlitros de perlas magnéticas y 80ml de mezcla de Lisis/Tampón de Unión se agregaron a una placa de fondo redondo y se mezclaron durante 1 minuto. Las perlas magnéticas se capturaron usando un soporte magnético y el sobrenadante se retiró sin alterar las perlas. Después de quitar el sobrenadante, las células lisadas se agregaron a las perlas restantes y se mezclaron durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, las perlas magnéticas se lavaron 2 veces con 150ml de Tampón de Lavado A y se mezclaron durante 1 minuto. Las perlas se capturaron nuevamente y se quitó el sobrenadante. Las perlas se lavaron luego con 150ml de Tampón de Lavado B, se capturaron y se retiró el sobrenadante. Las perlas se lavaron luego con 150 ml de Tampón de Elución, se capturaron y se retiró el sobrenadante. Las perlas se dejaron secar durante 2 minutos. Después de secarse, se agregaron 50 ml de Tampón de Elución y se mezcló durante 5 minutos a 70°C. Las perlas se capturaron sobre un imán durante 5 minutos. Se retiraron 40ml de sobrenadante y se agregaron a otra placa de 96 pocillos.

Síntesis de ADNc usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat No. 4368813)

Una mezcla principal de 1 µl de Tampón 10X, 0.4µl de dNTP 25X, 1µl de cebadores aleatorios, 0.5 µl de Transcriptasa Inversa, 0.5 µl de inhibidor de RNasa y 1.6µl de H₂O por reacción se agregaron a 5 µl de ARN total. Se generó ADNc usando un Bio-Rad C-1000 o ciclador térmico S-1000 (Hercules, CA) a través de las siguientes etapas: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 seg, 4°C de espera.

PCR en tiempo real

Se agregaron 2µl de ADNc a una mezcla principal que contenía 0.5µl de Sonda GAPDH TaqMan (Applied Biosystems Cat No. 4326317E (humana)), Cat No. 4308313 (roedor)), 0.5µl de sonda de TTR TaqMan (Applied Biosystems cat No. HS00174914 _m1 (humana) cat No. Rn00562124 _m1 (rata)) y 5µl de una mezcla principal de sonda Lightcycler 480 (Roche Cat No. 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (Roche cat No. 04887301001). La PCR en tiempo real se realizó en una máquina de PCR en Tiempo Real Roche LC 480 (Roche). Cada dúplex se evaluó en al menos dos transfecciones independientes y cada transfección se ensayó por duplicado, a menos que se indique lo contrario.

Para calcular el cambio múltiplo relativo, los datos en tiempo real se analizaron usando el método de $\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron a ensayos realizados con células transfectadas con 10nM AD-1955 o células transfectadas simuladas. Las Cl_{50} se calcularon usando un modelo de ajuste de 4 parámetros usando XLFit y se normalizaron a células transfectadas con AD-1955 (secuencia sentido: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 2202); secuencia antisentido: UCGAAGuCUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 2203)) o células sin tratamiento previo en el mismo rango de dosis, o a su dosis más baja. Las Cl_{50} se calcularon para cada transfección individual, así como en combinación, donde una sola Cl_{50} se ajustó a los datos de ambas transfecciones.

Los resultados del silenciamiento del dúplex de ARNip ejemplar con varias modificaciones de motivos de la invención se muestran en la Tabla 1 anterior.

Ejemplo 5: Actividad de silenciamiento in vitro de agentes de iARN modificados químicamente que se dirigen a TTR

Los siguientes experimentos demostraron los efectos beneficiosos de las modificaciones químicas, incluida la introducción de motivos de repetición en triplete, junto con un ligando GalNAc₃, en la actividad de silenciamiento de los agentes de iARN que se dirigen a TTR. Las secuencias de los agentes investigados se proporcionan en la Tabla 2 a continuación. Las regiones de complementariedad del ARNm de TTR son las siguientes: la región de complementariedad de los agentes de iARN AD-45165, AD-51546 y AD-51547 es

GGATGGGATTTTCATGTAACCAAGA (SEQ ID NO: 2204) y la región o complementariedad de los agentes de iARN AD-45163, AD-51544 y AD-51545 es TTCATGTAACCAAGAGTATTCAT (SEQ ID NO: 2205).

Protocolo para evaluación de CI_{50} en células Hep3B

5 La CI_{50} para cada ARNip modificado se determinó en las células Hep3B (una línea celular de hepatoma humano) mediante transfección inversa estándar usando Lipofectamina RNAiMAX. Brevemente, la transfección inversa se llevó a cabo agregando 5 μ L de Opti-MEM a 5 μ L de dúplex de ARNip por pocillo en una placa de 96 pocillos con 10 μ L de Opti-MEM más 0.5 μ L de Lipofectamina RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat No. 13778-150) e incubando a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Luego de la incubación, se agregaron 100 μ L de medios de cultivo completos sin antibiótico que contenían 12,000-15,000 de células Hep3B a cada pocillo. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ antes de lisis y análisis de TTR y ARNm de GAPDH por ADNb (Quantigene). Se evaluaron siete concentraciones de ARNip diferentes en el rango de 10nM a 0.6pM para determinar la CI_{50} y TTR/GAPDH para células transfectadas de ARNip se normalizó a las células transfectadas con 10nM de Luc ARNip. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Protocolo para evaluación de CI_{50} de libre captación

15 El silenciamiento de libre captación en hepatocitos de cynomolgus primarios se evaluó luego de la incubación con ARNip de TTR durante 4 horas o 24 horas. El silenciamiento se midió a las 24 horas desde la exposición inicial. En resumen, se recubrieron 96 pocillos con 0.05%-0.1% de colágeno (Sigma C3867-1VL) a temperatura ambiente, 24 horas antes del comienzo del experimento. El día del ensayo, los ARNip se diluyeron en Medios de Placas precalentadas que consisten en DMEM complementado con Kit de Medios de Mantenimiento de GIBCO (Serum-Free, Life Technologies CM4000) y se agregaron a las placas de cultivo de 96 pocillos recubiertas de colágeno. Los hepatocitos de cynomolgus primarios criopreservados se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C, e inmediatamente se diluyeron en Medios de Placas a una concentración de 360,000 células/mL. Un volumen de suspensión celular se colocó en pipetas cuidadosamente sobre los ARNip pre-emplacados de forma tal que el conteo celular final fue 18,000 células/pocillo. La placa se agitó suavemente para mezclar y propagar las células de manera uniforme en los pocillos y se colocó en una incubadora de 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas antes de la lisis y análisis de ARNm de TTR y GAPDH mediante ADNb (Quantigene, Affymetrix). En el caso de la incubación de 4 h con ARNip, los medios se decantaron después de 4 horas de exposición a las células, y se reemplazaron con Medios de Placas nuevos durante las 20 horas restantes de incubación. El análisis corriente abajo para ARNm de TTR y GAPDH fue el mismo que se describió anteriormente. Para una curva de respuesta a la dosis típica, los ARNip se titularon de 1 μ m a 0.24nM mediante una dilución en serie de 4 veces.

Tabla 2: Resumen de actividad in vitro para TTR-GalNAc alternadas y variantes con motivos en triplete

ID del dúplex	S (5'-3')	AS (5'-3')	Captación libre		CI50 de Hep3B (nM)
			4h	24h	
AD-45163	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUflL96 (SEQ ID NO: 2206)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsc (SEQ ID NO: 2212)	0.04101	0.00820	0.0115
AD-51544	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfaUflL96 (SEQ ID NO: 2207)	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsc (SEQ ID NO: 2213)	0.00346	0.00374	0.0014
AD-51545	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUflL96 (SEQ ID NO: 2208)	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfguuAfcAfusGfsc (SEQ ID NO: 2214)	0.00395	0.00389	0.0018
AD-45165	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAflL96 (SEQ ID NO: 2209)	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc (SEQ ID NO: 2215)	0.02407	0.00869	0.0112
AD-51546	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAflL96 (SEQ ID NO: 2210)	uCfuugGfuUfaCfaugAfaAfuuccCfasUfsc (SEQ ID NO: 2216)	0.00317	0.00263	0.0017
AD-51547	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaacCfaAfgAflL96 (SEQ ID NO: 2211)	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc (SEQ ID NO: 2217)	0.00460	0.00374	0.0028

Los nucleótidos en minúscula (a, u, g, c) indican nucleótidos de 2'-O-metilo; Nf (por ejemplo, Af) indican un nucleótido 2'-fluoro; s indica una conexión de fosforato; L96 indica un ligando de GalNAc3; los nucleótidos en negrita indican cambios con respecto al agente base correspondiente. Cada nucleótido en negrita se encuentra en el centro de un motivo en triplete.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 y demuestran que los agentes de iARN modificados que se dirigen a TTR proporcionan una actividad de silenciamiento mejorada.

Resultados: Actividad mejorada de agentes de iARN modificados

5 Los agentes de iARN base con modificaciones químicas alternadas y un ligando GalNAc₃ proporcionaron una CI₅₀ en células Hep3B de aproximadamente 0.01 nM. Tal como se muestra en las Figuras 4-5 y en la Tabla 2, los agentes modificados con respecto a los agentes base, por ejemplo, mediante la adición de uno o más tripletes de repetición de modificaciones 2'-fluoro y 2'-O-metilo, mostraron una actividad de silenciamiento inesperadamente mejorada, alcanzando valores de CI₅₀ en células Hep3B que fueron 5-8 veces mejores que el agente base correspondiente.

Resultados: CI₅₀ de captación libre en células Hep3B

10 Tal como se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 6-7, los agentes de iARN modificados con respecto al AD-45163 base también mostraron un silenciamiento de captación libre mejorado. Los agentes modificados mostraron más del doble de actividad de silenciamiento de la base después de un período de incubación de 24 horas y casi 10 veces la actividad de silenciamiento de la base después de un período de incubación de 4 horas.

15 Tal como se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 8-9, los agentes de iARN modificados con respecto al AD-45165 base también mostraron un silenciamiento de captación libre mejorado. Los agentes modificados mostraron 2-3 veces la actividad de silenciamiento de la base después de un período de incubación de 24 horas y 5-8 veces la actividad de silenciamiento de la base después de un período de incubación de 4 horas.

20 Tomados colectivamente, estos resultados demuestran que los agentes de iARN modificados presentados en la presente, por ejemplo, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547, mostraron inesperadamente una buena inhibición del ARNm de TTR en experimentos de silenciamiento in vitro.

Ejemplo 6: Silenciamiento de ARNm de TTR y supresión de proteína TTR en ratones transgénicos

25 Para evaluar la eficacia de los agentes de iARN AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-45165, AD-51546 y AD-51547, estos agentes se administraron a ratones transgénicos que expresan transtiretina humana con la mutación V30M (ver Santos, SD., Fernaandes, R., y Saraiva, MJ. (2010) *Neurobiology of Aging*, 31, 280-289). Se sabe que la mutación V30M provoca polineuropatía amiloide familiar tipo I en humanos. Ver, por ejemplo, Lobato, L. (2003) *J Nephrol.*, 16(3):438-42.

30 Los agentes de iARN (en tampón de PBS) o testigo de PBS se administraron a ratones (2 machos y 2 hembras) de 18-24 meses de edad en una sola dosis subcutánea de 5 mg/kg o 1 mg/kg. Después de aproximadamente 48 horas, los ratones se anestesiaron con 200 µl de cetamina, y luego se desangraron cortando la arteria caudal correcta. Se aisló sangre entera y plasma y se almacenó a -80°C hasta el ensayo. Se recogió el tejido del hígado, se congeló instantáneamente y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

35 La eficacia del tratamiento se evaluó mediante (i) medición de ARNm de TTR en el hígado 48 horas post-dosis, y (ii) medición de proteína TTR en plasma antes del sangrado y 48 horas post-dosis. Los niveles de ARNm hepático de TTR se ensayaron utilizando los ensayos de ADN ramificado - QuantiGene 2.0 (Panomics cat No.: QS0011). Brevemente, se molieron las muestras de hígado de ratón y se prepararon lisados de tejido. La mezcla de lisis de hígado (una mezcla de 1 volumen de mezcla de lisis, 2 volúmenes de agua libre de nucleasa y 10ul de Proteínasa-K/ml para una concentración final de 20mg/ml) se incubó a 65°C durante 35 minutos. 20µl del conjunto de sonda de trabajo (sonda TTR para direccionamiento a genes y GAPDH para control endógeno) y 80ul de lisado de tejido se agregaron entonces en la placa de captura. Las placas de captura se incubaron a 55°C ± 1°C (aproximadamente 16-20hrs). Al día siguiente, las placas de captura se lavaron 3 veces con 1X Tampón de Lavado (agua libre de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), y luego se secaron mediante la centrifugación durante 1 minuto a 240g. Se agregaron 100µl de un reactivo de trabajo pre-amplificador en la placa de captura, que se selló con una lámina de aluminio y se incubó durante 1 hora a 55°C ± 1°C. Después de 1 hora de incubación, se repitió la etapa de lavado, luego se agregaron 100µl de reactivo de trabajo amplificador. Después de 1 hora, las etapas de lavado y secado se repitieron, y se agregaron 100µl de sonda de etiqueta. Las placas de captura se incubaron 50°C ± 1°C durante 1 hora. La placa se lavó entonces con 1X de Tampón de Lavado, se secó y se agregaron 100µl de sustrato en la placa de captura. Las placas de captura se leyeron utilizando el Luminómetro SpectraMax seguido por 5 a 15 minutos de incubación. Los datos de bADN se analizaron sustrayendo del antecedente promedio de cada muestra por triplicado, promediando el GAPDH por triplicado resultante (sonda testigo) y valores TTR (sonda experimental) y luego computando la relación: (sonda experimental-antecedente)/(sonda testigo-antecedente).

55 Los niveles de TTR en plasma se ensayaron utilizando el kit disponible comercialmente "AssayMax Human Prealbumin ELISA Kit" (AssayPro, St. Charles, MO, No. de catálogo EP3010-1) de acuerdo con las pautas del fabricante. Brevemente, se diluyó plasma de ratón 1:10,000 en 1X de diluyentes de mezcla y se agregó a placas previamente recubiertas junto con estándares del kit y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de 5 lavados con tampón de lavado del kit. Se agregaron cincuenta microlitros de anticuerpo de prealbúmina biotilado a cada pocillo y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente, seguido de 5 lavados con tampón de lavado. Se

agregaron cincuenta microlitros de conjugado de estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, con posterior lavado como se describió anteriormente. La reacción se desarrolló mediante la adición de 50 μ l/pocillo de sustrato de cromógeno e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con detención de la reacción mediante la adición de 50 μ l/pocillo de solución de detención. Se leyó la absorbancia a 450 nm en una lectora de placas Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y los datos se analizaron utilizando el paquete informático Softmax 4.6 (Molecular Devices).

Los resultados se muestran en las Figuras 10-12. La Figura 10 muestra que los agentes de iARN, modificados con respecto a los agentes AD-45163 y AD-45165 base, mostraron una actividad de silenciamiento de ARN que fue similar o más potente que la de los agentes base. La Figura 11 muestra que los agentes AD-51544 y AD-51545 mostraron actividad de silenciamiento dependiente de la dosis y que la actividad de silenciamiento de estos agentes a una dosis de 5mg/kg fue similar a la del correspondiente AD-45163 base. La Figura 12 muestra que los agentes AD-51546 y AD-51547 también mostraron actividad de silenciamiento dependiente de la dosis. Más aun, la actividad de silenciamiento de AD-51546 y AD-51547 a una dosis de 5mg/kg fue superior a la del correspondiente AD-45165 base.

15 **Ejemplo 7: Perfiles farmacocinéticos en suero e hígado de agentes de iARN que se dirigen a la TTR en ratones**

Para evaluar los perfiles farmacocinéticos de los agentes de iARN AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547, estos agentes, en tampón de PBS, se administraron a ratones **C57BL/6 usando un solo bolo IV o administración subcutánea (SC). Las concentraciones en plasma y concentraciones en hígado de los agentes se evaluaron en distintos momentos después de la administración.**

Los parámetros farmacocinéticos en plasma se presentan en las Tablas 3 y 4 a continuación. El tiempo de permanencia medio (MRT) en plasma fue de aproximadamente 0.2 horas después de la dosificación IV y aproximadamente 1 después de la dosificación SC. A una dosis de **25 mg/kg, los agentes** AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547 mostraron propiedades farmacocinéticas similares. Cada uno de estos agentes tuvo más de 75% biodisponibilidad del espacio subcutáneo. Su biodisponibilidad fue superior a la del agente AD-45163 base, que se administró a una dosis más alta de 30 mg/kg. La biodisponibilidad subcutánea de AD-51544 y AD-51547 fue de aproximadamente 100%, mientras que la de AD-51545 fue 90% y la de AD-51546 fue de 76%.

Tabla 3: Resumen de estimaciones de parámetros farmacocinéticos en plasma después de la administración SC de ARNip de TTR-GalNAc en ratones

Parámetro	30 mpk AD-45163 (h/c TTR-GalNAc)	25 mpk AD-51544 (h/c TTR-GalNAc)	25 mpk AD-51545 (h/c TTR-GalNAc)	25 mpk AD-51546 (h/c TTR-GalNAc)	25 mpk AD-51547 (h/c TTR-GalNAc)
Plasma T _{máx} (h)	0.25	1	0.5	1	0.5
Plasma C _{máx} (μ g/mL)	9.6	11.7	10.9	11.7	12.1
Plasma AUC (h* μ g/mL)	12.4	21.9	19.9	20.9	25.3
F _{sc} (%)	79	100	90.1	76.0	99.2

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de ARNip en plasma después de un bolo IV o dosis SC de AD-51544, 51545, 51546 o 51547 a 25 mg/kg

Artículo de prueba	AD-51544		AD-51545		AD-51546		AD-51547	
	25		25		25		25	
Dosis de ARNip (mg/kg)								
Ruta de administración	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC
t _{máx} (h)	0.083	1	0.083	0.5	0.083	1	0.083	0.5
C _{máx} (µg/mL)	96.5 ^a	11.7	108 ^a	10.9	128 ^a	10.9	123 ^a	12.1
AUC _{0-últ} (h·µg/mL)	21.6	21.9	22.1	19.9	27.5	20.9	25.5	25.3
MRT _{0-últ} (h)	0.17	1.2	0.16	1.1	0.22	1.4	0.19	1.3
t _{1/2β} (h) ^b aparente	ND	ND	ND	0.49	ND	1.2	ND	0.56
FSC (%) ^c	-	102	-	90.1	-	76.0	-	99.2

a: Concentración en la 1^a muestra (5 min) después de la dosificación IV

b: La semivida de eliminación aparente (t_{1/2β}) no pudo determinarse (ND) para ninguno de los 4 artículos de prueba después de la dosificación IV, dado que la fase terminal de los perfiles de concentración-tiempo no estuvo bien definida y, como resultado, los parámetros farmacocinéticos asociados a la t_{1/2β} (por ejemplo, AUC_{0-∞}, CL y V_{ss}) no se indicaron.

c: Biodisponibilidad SC, calculada como relación porcentual de AUC_{0-últ} después de la dosificación SC e IV a 25 mg/kg

Los resultados también indicaron que los agentes de iARN AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547 lograron concentraciones similares o mayores en el hígado cuando se administraron subcutáneamente que cuando se administraron mediante bolo IV. Los parámetros farmacocinéticos hepáticos se presentan en las Tablas 5 y 6 a continuación. La concentración pico ($C_{máx}$) y el área bajo la curva ($AUC_{0-últ}$) en el hígado fueron dos a tres veces más altas después de la administración subcutánea en comparación con la administración IV del mismo agente a la misma dosis. La exposiciones en el hígado fueron más altas para AD-51547 y más bajas para AD-51545. El tiempo de permanencia medio (MRT) y la semivida de eliminación fueron mayores para AD-51546 y AD-51547 en comparación con AD-51544 y AD-51545. Luego de la administración subcutánea, MRT aproximados fueron 40 horas para AD-51546 y 25 horas para AD-51547, mientras que los MRT para AD-51544 y AD-51545 fueron menores (aproximadamente 6-9 horas). La semivida de eliminación de AD-51546 y AD-51547 también fue más alta (41-53 horas) que la semivida de eliminación de AD-51544 y AD-51545 (6-10 horas).

Tabla 5: Resumen de estimaciones de parámetros farmacocinéticos en hígado después de la administración SC de ARNip de TTR-GaINAc en ratones

Parámetro	30 mpk AD-45163 TTR-GaINAc (h/c)	25 mpk AD-51544 TTR-GaINAc (h/c)	25 mpk AD-51545 TTR-GaINAc (h/c)	25 mpk AD-51546 TTR-GaINAc (h/c)	25 mpk AD-51547 TTR-GaINAc (h/c)
T _{máx} hígado (h)	8	4	4	2	8
C _{máx} hígado (µg/g)	313	126	80	117	174
AUC hígado (h*µg/g)	4519	1092	763	2131	4583

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de ARNip en hígado en ratones después de un bolo IV o dosis SC de AD-51544, 51545, 51546 o 51547 a 25 mg/kg

Artículo de prueba	AD-51544		AD-51545		AD-51546		AD-51547	
	25		25		25		25	
Dosis de ARNip (mg/kg)								
Ruta de administración	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC
$t_{\text{máx}}$ (h)	1	4	1	4	4	2	2	8
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/g}$)	67.9	126	37.0	80.5	35.3	117	73.8	174
$AUC_{0-\text{ult}}$ (h· $\mu\text{g/g}$)	632	1092	324	763	984	2131	1429	4583
$MRT_{0-\text{ult}}$ (h)	8.7	6.5	5.9	8.5	45.7	40.2	29.4	25.3
$t_{1/2\beta}$ (h) aparente	8.1	8.2	5.7	10.0	51.1	45.3	41.1	52.7

Ejemplo 8: Estabilidad in vitro de agentes de iARN en suero de mono

La estabilidad en suero de los agentes de iARN AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547 también se evaluó en monos. Los resultados demostraron que las hebras antisentido y sentido de AD-51544, AD-51545 y AD-51547 mostraron estabilidad en suero en un período de aproximadamente 24 horas (datos no se muestran).

5 Ejemplo 9: Agentes de iARN Producen supresión duradera de proteína TTR en primates no humanos

La actividad de silenciamiento de ARN de agentes de iARN AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547 se evaluó midiendo la supresión de proteína TTR en suero de monos cynomolgus luego de la administración subcutánea de cinco dosis de 5 mg/kg (una dosis cada día durante 5 días) o una sola dosis de 25 mg/kg. Los niveles de proteína TTR pre-dosis en suero se evaluaron promediando los niveles a los 11 días antes de la primera dosis, 7 días antes de la primera dosis y 1 día antes de la primera dosis. Los niveles post-dosis en suero de proteína TTR se evaluaron determinando el nivel en suero a partir de 1 día después de la dosis final (es decir, el día 5 del estudio en el grupo de 5x5 mg/kg y el día 1 del estudio en el grupo de 1x25 mg/kg) hasta 49 días después de la última dosis (es decir, día 53 del estudio en el grupo de 5x5 mg/kg y día 49 del estudio en el grupo de 1x25 mg/kg). Ver la Figura 13.

10 Los niveles de proteína TTR se evaluaron como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 14 y en las Tablas 7 y 8.

15 Se alcanzó una supresión de proteína TTR de hasta aproximadamente 50% en los grupos que recibieron 25 mg/kg de AD-45163, AD-51544, AD-51546 y AD-51547 (ver la Tabla 8). Se alcanzó una mayor supresión de proteína TTR máxima de aproximadamente 70% en los grupos que recibieron 5x5 mg/kg de AD-45163, AD-51544, AD-51546 y AD-51547 (ver la Tabla 7). El agente AD-51545 produjo un menor grado de supresión en ambos protocolos de administración. Una supresión significativa de aproximadamente 20% o más persistió por hasta 49 días después de la última dosis de AD-51546 y AD-51547 en ambos protocolos de 1x25 mg/kg y 5x5 mg/kg. En general, se logró una mejor supresión en el protocolo de 5x5 mg/kg que en el protocolo de 1x25 mg/kg.

Tabla 7 Transtiretina en suero de fracciones con relación a la pre-dosis en monos cynomolgus (5 mg/kg por día durante 5 días)

	D-11	D-7	D-1	D5	D7	D9	D11	D14	D18	D22	D26	D32	D39	D46	D53
AD-45163	0.98	0.99	1.03	0.71	0.52	0.40	0.34	0.27	0.31	0.39	0.48	0.64	0.68	0.81	0.88
AD-51544	1.02	0.99	0.99	0.60	0.47	0.37	0.35	0.39	0.48	0.58	0.66	0.74	0.83	0.91	0.92
AD-51545	1.03	0.97	1.00	0.73	0.65	0.63	0.69	0.68	0.78	0.87	0.97	1.00	1.03	1.06	1.09
AD-51546	1.01	0.97	1.02	0.59	0.42	0.35	0.30	0.32	0.43	0.58	0.66	0.77	0.92	0.93	0.97
AD-51547	0.99	0.99	1.02	0.74	0.54	0.41	0.34	0.34	0.39	0.49	0.51	0.53	0.65	0.70	0.77

Tabla 8 Transtiretina en suero de fracciones con relación a la pre-dosis en monos cynomolgus (25 mg/kg)

	D-11	D-7	D-1	D1	D3	D5	D7	D10	D14	D18	D22	D28	D35	D42	D49
AD-45163	1.04	1.01	0.95	0.99	0.84	0.67	0.57	0.44	0.45	0.51	0.58	0.66	0.72	0.78	0.85
AD-51544	1.01	1.04	0.95	0.92	0.69	0.57	0.49	0.48	0.56	0.65	0.69	0.77	0.83	0.87	0.94
AD-51545	0.98	1.02	0.99	0.87	0.77	0.69	0.71	0.72	0.84	0.90	0.92	0.99	1.00	1.00	1.00
AD-51546	1.04	1.03	0.93	0.89	0.71	0.62	0.53	0.50	0.55	0.70	0.70	0.69	0.72	0.79	0.84
AD-51547	0.96	1.03	1.01	1.19	0.90	0.70	0.54	0.48	0.50	0.50	0.52	0.58	0.62	0.70	0.72

Ejemplo 10: Tolerabilidad de agentes de iARN que se dirigen a TTR**Evaluación en citoquina en ensayo de sangre entera**

5 Para evaluar la tolerabilidad de agentes de iARN que se dirigen a TTR (incluidos AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547), cada agente se evaluó en un ensayo de sangre entera usando sangre de tres donantes humanos. Los agentes son reactivo transfectado DOTAP 300 nM o 1 μ M sin transfección (ARNip libre). Se produjo un cambio menor que 2x para las siguientes citoquinas/quimioquinas: G-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p70), IL1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α . (Los resultados no se muestran).

Evaluación in vivo

10 Para evaluar la tolerabilidad in vivo se inyectaron agentes de iARN subcutáneamente en ratones CD1 a una dosis de 125 mg/kg. No se observó inducción de citoquina a las 2, 4, 6, 24 o 48 horas después de la inyección subcutánea de AD-45163. No se observó una inducción de citoquina significativa a las 6 o 24 horas después de la inyección subcutánea de AD-51544, AD-51545, AD-51546 o AD-51547.

15 Para evaluar adicionalmente in vivo la tolerabilidad, múltiples agentes de iARN (incluidos AD-45163, AD-51544, AD-51545, AD-51546 y AD-51547) se evaluaron mediante inyección subcutánea de 5 y 25 mg en primates no humanos (monos cynomolgus) con volúmenes de dosis entre 1-2 ml por sitio. No se observaron eritemas ni edemas en los sitios de inyección.

Estudio de tolerabilidad en ratas con dosis única SC

20 Para evaluar la toxicidad se inyectaron ratas con una sola dosis subcutánea de 100, 250, 500 o 750 mg/kg de AD-45163 (ver la Tabla 9). Se realizaron las siguientes evaluaciones: signos clínicos de toxicidad, peso corporal, hematología, química clínica y coagulación, peso de órganos (hígado y bazo); evaluación a grandes rasgos y microscópica (riñón, hígado, pulmón, nodo linfático, bazo, testículos, timo, aorta, corazón, intestinos (delgado y grueso)).

Tabla 9: Estudio de tolerabilidad en ratas con dosis única SC: 100, 250, 500 y 750 mg/kg de AD-45163 in ratas Sprague Dawley

Grupo	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Ruta y régimen	No. Male Ratas Sprague Dawley	Día de necropsia
PBS	0	10	Inyección SC Día 1 (2 sitios)	7/grupo (5 animales Tox, 2 animales TK)	Día 4
Base AD-45163	100				
	250				
	500				
	750				

25 Los resultados no mostraron ningún signo clínico de toxicidad, efecto en el peso corporal, peso de órganos o química clínica relacionados con el artículo de prueba. No se observó histopatología en corazón, riñones, testículos, bazo, hígado y timo. Se produjo un leve aumento en el recuento de glóbulos blancos no adverso relacionado con el artículo de prueba (\uparrow 68%, principalmente atribuido al aumento en NEUT y MONO) con 750 mg/kg. Estos resultados indican que una dosis única de hasta 750 mg/kg es bien tolerada en ratas.

Tolerabilidad de administraciones subcutáneas repetidas en ratas

30 Para evaluar la tolerabilidad de administraciones subcutáneas repetidas de AD-45163 se administraron inyecciones subcutáneas de 300 mg/kg durante 5 días y se realizó una necropsia en el día 6. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 10.

35 **Tabla 10: Estudio de tolerabilidad de dosis repetidas en rata**

Grupo	Nivel de dosis (kmg/kg)	Conc. (mg/mL)	No. de animales tox.	Nx día 6
PBS	0	0	2M, 2H	2M, 2H
AD-45163	300	150	2M, 2H	2M, 2H

Se evaluaron las siguientes variables resultantes: signos clínicos, pesos corporales, hematología, química clínica y coagulación, peso de órganos, evaluación a grandes rasgos y microscópica (hígado, bazo, riñón, corazón, tracto GI y primer y último sitio de inyección). Los resultados no mostraron signos clínicos ni efectos en el peso corporal o en el peso de los órganos relacionados con el artículo de prueba y tampoco hallazgos relacionados con el artículo de prueba en la hematología o química clínica. Se produjo una posible prolongación leve del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) el día 6 (20.4 vs. 17.4 seg). La histopatología no reveló ningún hallazgo relacionado con el artículo de prueba en el hígado, bazo, corazón y tracto GI. En el riñón, se observó una hipertrofia mínima a leve del epitelio tubular (no adversa). En el último sitio de inyección hubo una infiltración mononuclear multifocal mínima no adversa. Estos resultados indican que cinco dosis diarias de 300 mg/kg del agente de iARN base AD-45163 fueron bien toleradas en ratas.

Ejemplo 11: Agentes de iARN producen supresión duradera de proteína TTR en primates no humanos

La actividad de silenciamiento de ARN del agente de iARN AD-51547 se evaluó midiendo la supresión de proteína TTR en suero de monos cynomolgus luego de la administración subcutánea de una "fase de carga" del agente de iARN: cinco dosis diarias de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg (una dosis cada día durante 5 días) seguida de una "fase de mantenimiento" del agente de iARN: dosificación semanal de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg durante 4 semanas. Los niveles de proteína TTR en suero pre-dosis se evaluaron promediando los niveles a los 11 días antes de la primera dosis, 7 días antes de la primera dosis y 1 día antes de la primera dosis. Los niveles de proteína TTR en suero post-dosis se evaluaron determinando el nivel en suero con relación a la pre-dosis comenzando el día 1 después de que la fase de carga se había completado hasta el día 40 después de la última dosis de la fase de mantenimiento (es decir, el día 70 del estudio).

Los niveles de proteína TTR se evaluaron como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 15.

Se alcanzó una supresión de proteína TTR de hasta aproximadamente 80% en todos los grupos que recibieron **2.5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg** de AD-51547. Se alcanzó el silenciamiento en el nadir en todos los grupos aproximadamente el día 14, la supresión experimentada en niveles de silenciamiento en el nadir con una dosis de mantenimiento semanal de **2.5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg** de AD-51547. Los niveles de TTR no habían vuelto al valor del inicio más de 40 días después de la administración de la última dosis de mantenimiento para los niveles de dosis de 5 y 2.5 mg/kg.

REIVINDICACIONES

1. Un agente de iARN de doble hebra que comprende una hebra sentido complementaria a una hebra antisentido, en donde dicha hebra antisentido comprende una región básicamente complementaria a la secuencia de nucleótidos 5'-GGATGGGATTCATGTAACCAAGA-3' (SEQ ID NO:2204), en donde la hebra sentido tiene un total de 21 nucleótidos y la hebra antisentido tiene un total de 23 nucleótidos, en donde dicho agente de iARN de doble hebra está representado por la fórmula (III):

sentido: 5' n_p - N_a -(XXX)_i- N_b -YYY- N_b -(ZZZ)_j- N_a - n_q 3'

antisentido: 3' $n_{p'}$ - $N_{a'}$ -(X'X'X')_k- $N_{b'}$ -Y'Y'Y'- $N_{b'}$ -(Z'Z'Z')_l- $N_{a'}$ - $n_{q'}$ - 5'

(III)

10 en donde:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1, en donde i es 0, j es 1;

p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

15 cada N_a y $N_{a'}$ representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente; en donde cada N_b y $N_{b'}$ representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos modificados; en donde las modificaciones son 2'-O-metilo, 2'-fluoro o ambas;

cada n_p , $n_{p'}$, n_q y $n_{q'}$ representa independientemente un nucleótido saliente;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos;

20 en donde los nucleótidos Y contienen una modificación 2'-fluoro y los nucleótidos Y' contienen una modificación 2'-O-metilo; en donde dicho motivo YYY ocurre en las posiciones 9, 10 y 11 cuando la región dúplex tiene 21 nucleótidos;

donde la hebra sentido está conjugada con al menos un ligando, en donde el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlazante ramificado bivalente o trivalente;

25 en donde "básicamente complementario" significa que no hay más de 2 pares de bases no coincidentes en el intervalo de 2 nucleótidos desde el extremo 5' y/o 3'; y

en donde fosforotioato está presente en los dos últimos nucleótidos en uno o ambos extremos.

2. El agente de iARN de la reivindicación 1, en donde k es 0 y l es 1.

3. El agente de iARN de la reivindicación 1 o 2, en donde

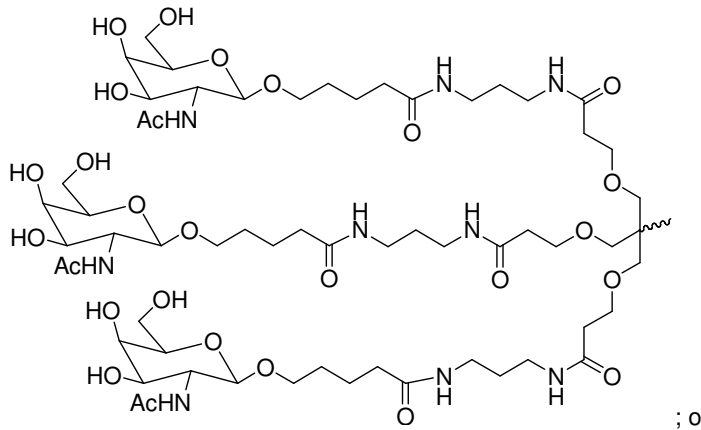
30 (a) YYY es complementario a Y'Y'Y', y ZZZ es complementario a Z'Z'Z'; y/o

(b) el motivo Y'Y'Y' ocurre en las posiciones 11, 12 y 13 de la hebra antisentido desde el extremo 5'.

4. El agente de iARN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región dúplex tiene una longitud de 21 pares de nucleótidos.

5. El agente de iARN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ligando es

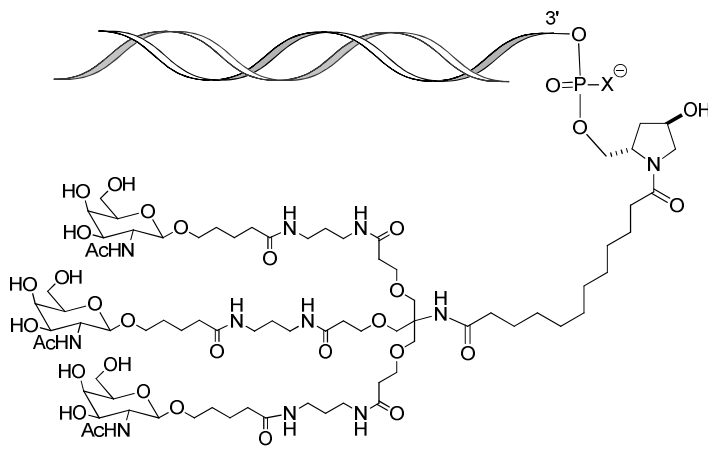
35 a)



b) está unido al extremo 3' de la hebra sentido.

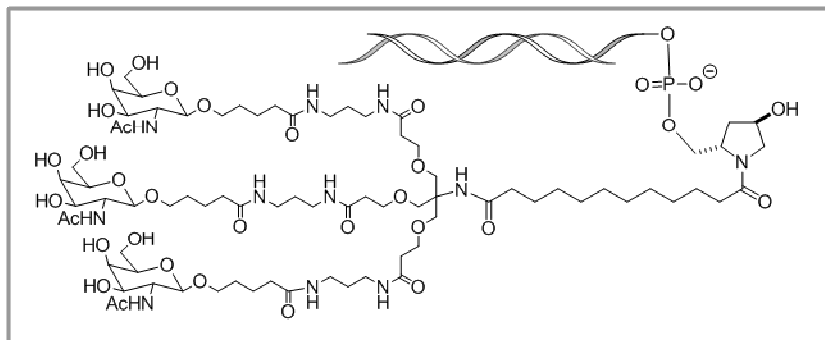
6. El agente de iARN de la reivindicación 5, en donde el agente de iARN se conjuga con el ligando tal como se muestra en el siguiente esquema

5



en donde X es O o S, o

tal como se muestra en el siguiente esquema



10

7. Una célula in vitro que contiene el agente de iARN de doble hebra de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Una composición farmacéutica que comprende un agente de iARN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde
- (a) dicho agente de iARN se administra
- 5 (i) en una solución sin tamponar, en donde preferiblemente dicha solución sin tamponar es solución salina o agua;
- (ii) con una solución tamponadora, en donde preferiblemente dicha solución tamponadora comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos, en donde más preferiblemente dicha solución tamponadora es solución salina tamponada con fosfato (PBS); o
- 10 (b) dicha composición farmacéutica es
- (i) un liposoma; o
- (ii) una formulación lipídica.
10. Un método in vitro para inhibir la expresión de una transtiretina (TTR) en una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un agente de iARN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o con una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de dicha TTR en dicha célula, inhibiendo así la expresión de dicha transtiretina (TTR) en dicha célula, en donde preferiblemente la expresión de dicha TTR se inhibe al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%.
- 15
11. Un agente de iARN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica de la reivindicación 8 o 9 para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con TTR en un sujeto.
- 20
12. El agente o composición para uso de la reivindicación 11, en donde la expresión de TTR en una muestra derivada de dicho sujeto se inhibe al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%.
- 25
13. El agente o la composición para uso de la reivindicación 11, en donde dicho sujeto es un humano.
14. El agente o la composición para uso de la reivindicación 11, en donde dicho sujeto es un sujeto
- (a) que padece una enfermedad asociada a TTR; o
- (b) que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a TTR.
- 30
15. El agente o la composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde dicho sujeto porta una mutación del gen de TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a TTR, en donde preferiblemente dicha enfermedad asociada a TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (ASS), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (PAF), cardiomiopatía amiloidótica familiar (CAF), amiloidosis leptomeníngea/del Sistema Nervioso Central (SNC) e hipertiroxinemia.
- 35
16. El agente o la composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde dicho agente de iARN se va a administrar a una dosis de 0.05-50 mg/kg.

FIG. 1

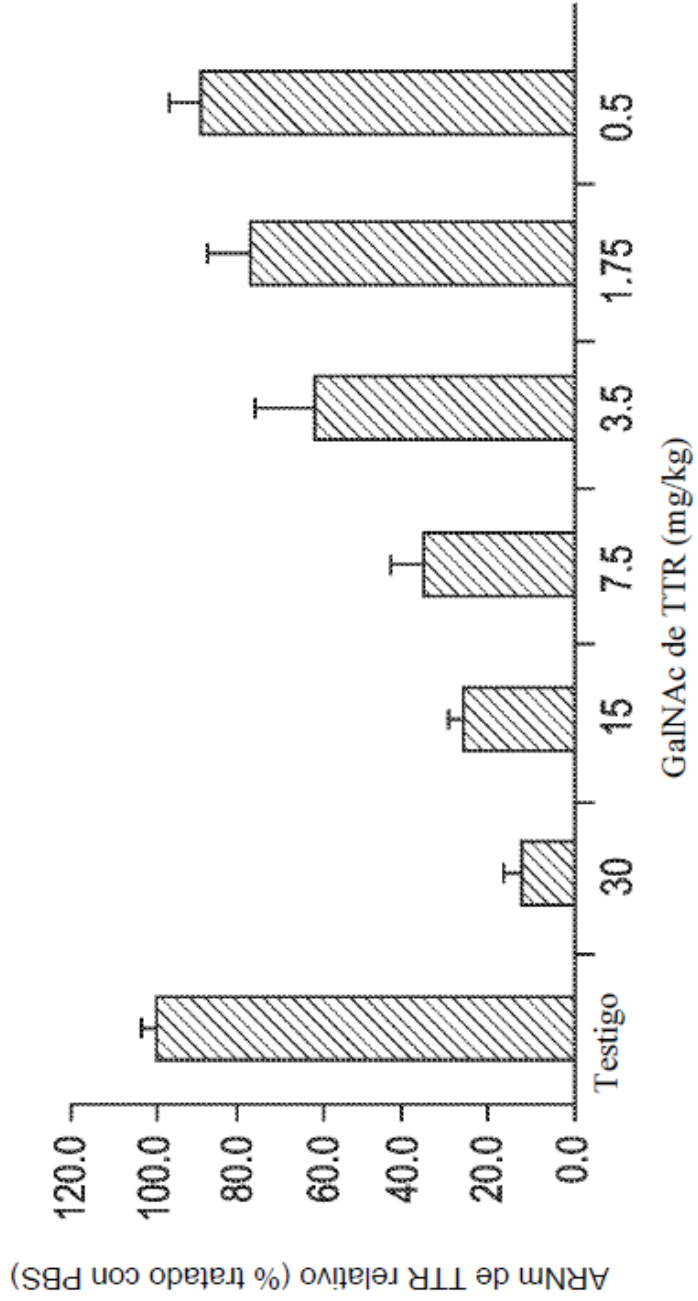


FIG. 2

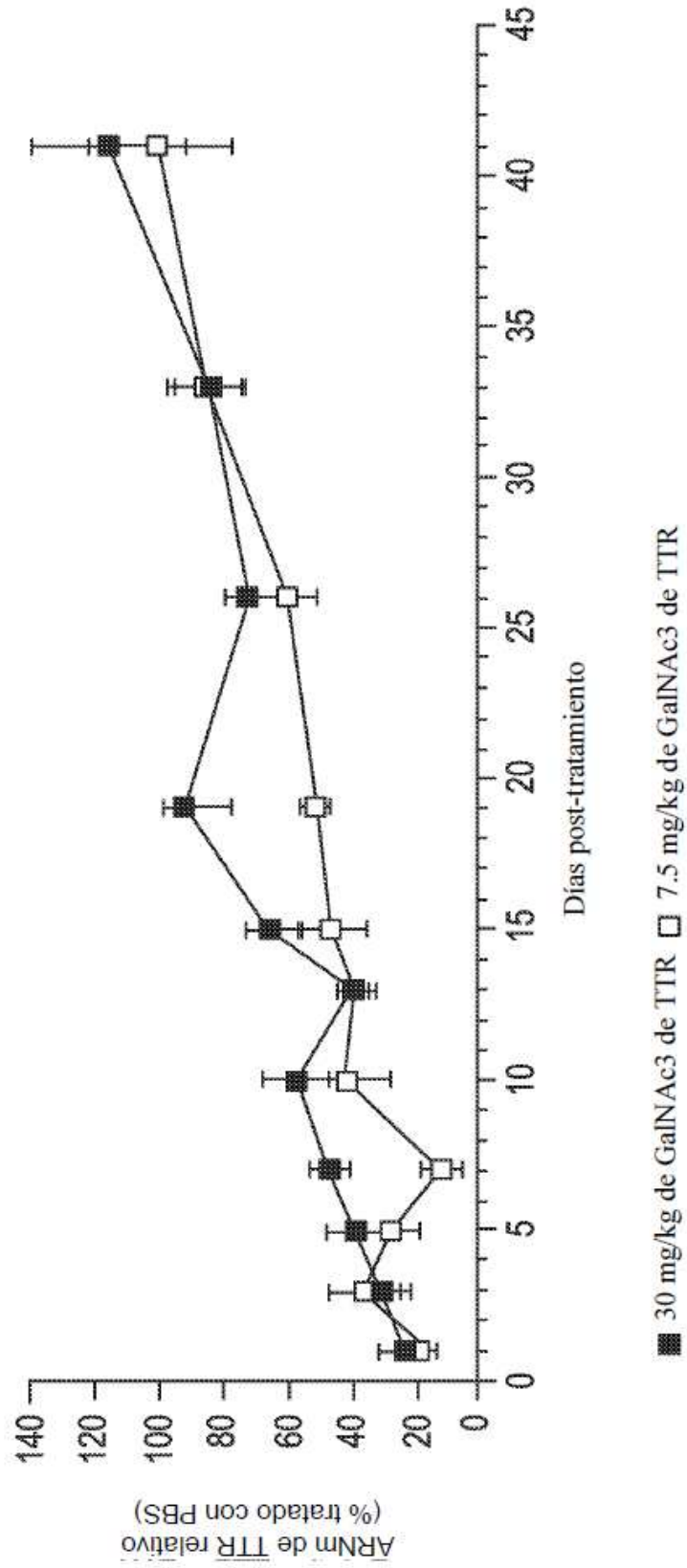


FIG. 3

Secuencia de ARNm de TTR humana (SEQ ID NO: 1), No. de Acceso Gen Bank.: M10605,
GI: 189583

```

1  cagaagtcca  ctattcttg  gcaggatggc  ttctcatcgt  ctgctcctcc  tctgccttgc
61  tggactggta  tttgtgtctg  aggctggccc  tacgggcacc  ggtgaatcca  agtgtcctct
121  gatggtcaaa  gttctagatg  ctgtccgagg  cagtcctgcc  atcaatgtgg  ccgtgcatgt
181  gttcagaaa  gctgctgatg  acacctggga  gccatttgcc  tctgggaaaa  ccagtgagtc
241  tggagagctg  catgggctca  caactgagga  ggaatttgta  gaagggatat  acaaagtggg
301  aatagacacc  aatcttact  ggaaggcact  tggcatctcc  ccattccatg  agcatgcaga
361  ggtggtattc  acagccaacg  actccggccc  ccgccgtac  accattgccg  ccctgctgag
421  cccctactcc  tattccacca  cggctgtcgt  caccaatccc  aaggaatgag  ggacttctcc
481  tccagtggac  ctgaaggacg  agggatggga  tttcatgtaa  ccaagagtat  tccattttaa
541  ctaaagcagt  gttttcacct  catatgctat  gttagaagtc  cagggcagaga  caataaaca
601  ttcctgtgaa  aggc

```

FIG. 4

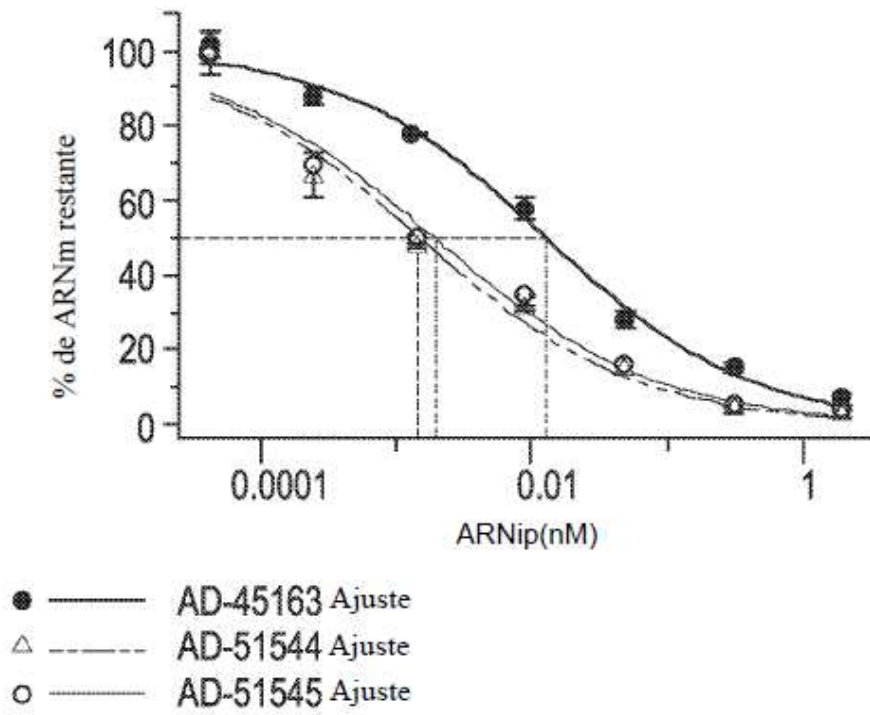
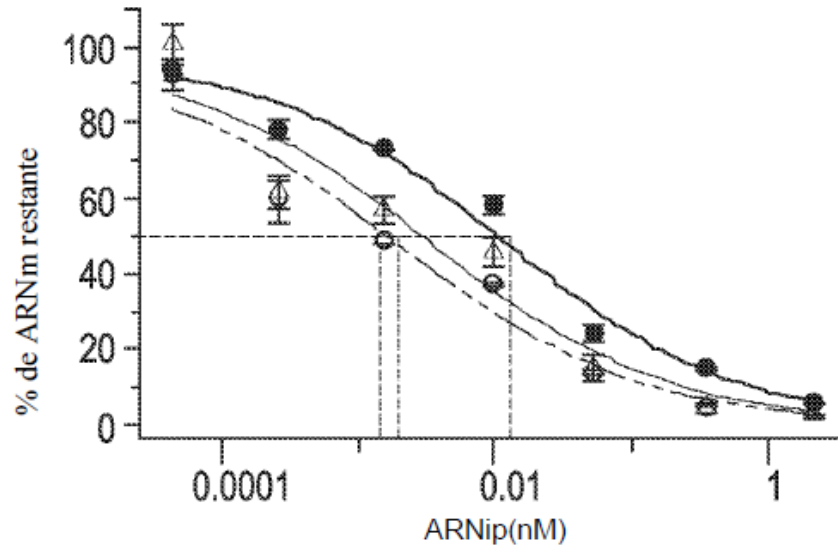
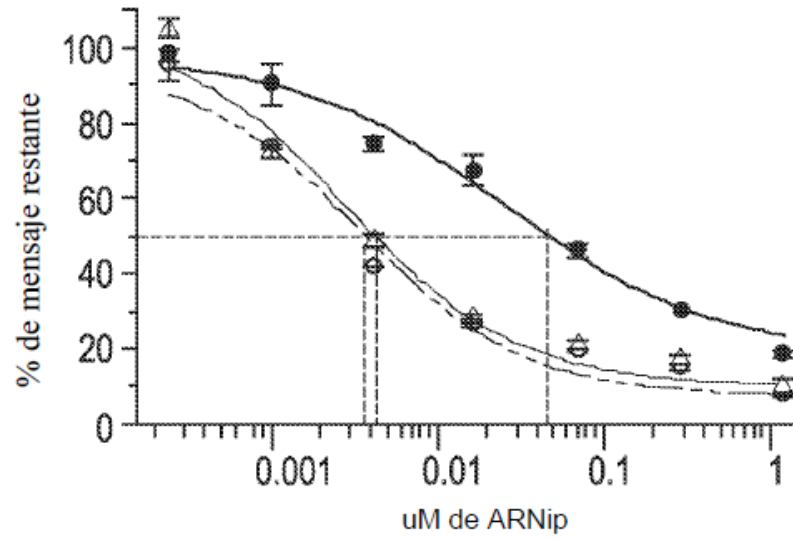


FIG. 5



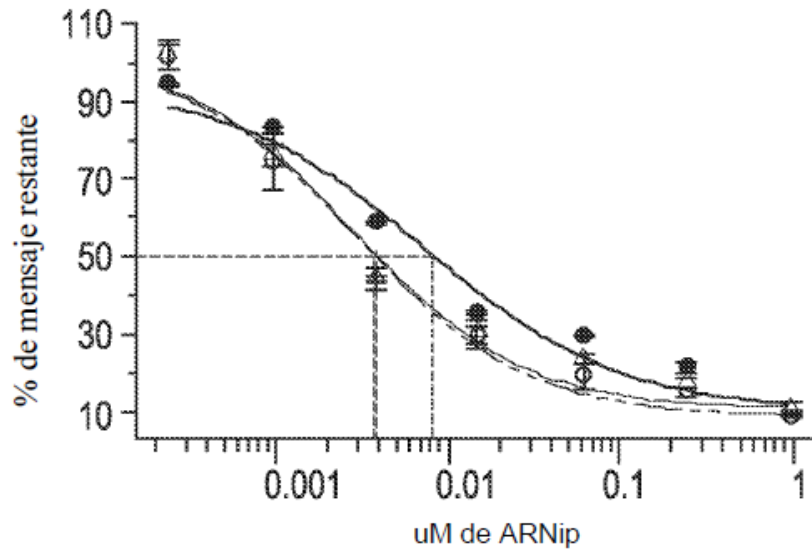
- — AD-45165 Ajuste
- △ - - AD-51546 Ajuste
- — AD-51547 Ajuste

FIG. 6



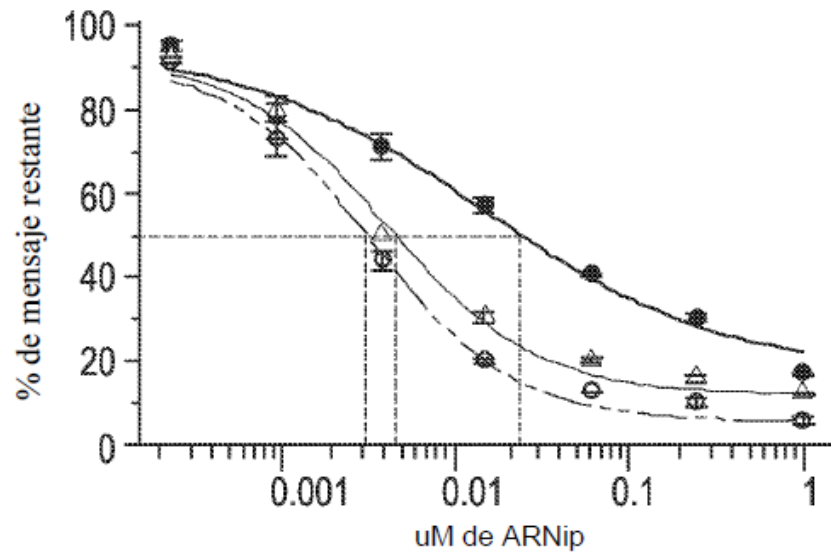
- — 45163, Ajuste de 4 hr
- △ - - - 51544, Ajuste de 4 hr
- — 51545, Ajuste de 4 hr

FIG. 7



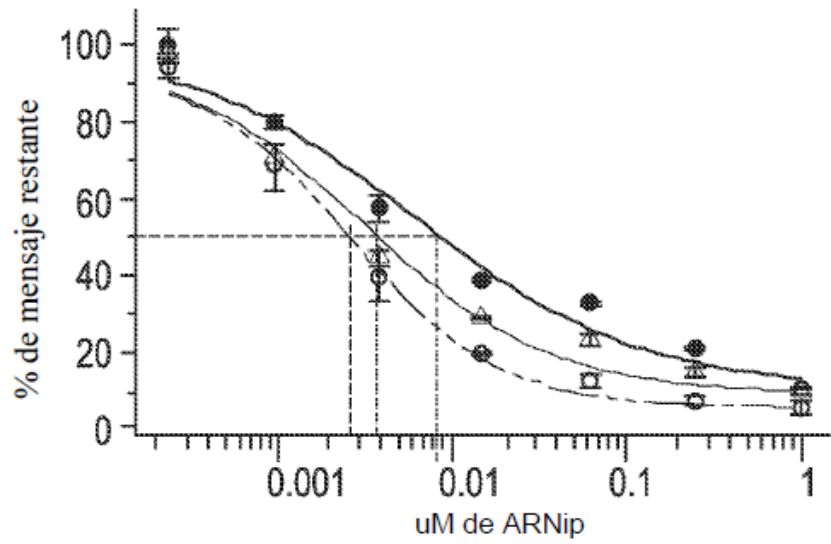
- ——— 45163, Ajuste de 24 hr
- △ - - - - 51544, Ajuste de 24 hr
- ——— 51545, Ajuste de 24 hr

FIG. 8



- — 45165, Ajuste de 4 hr
- △ - - - 51546, Ajuste de 4 hr
- — 51547, Ajuste de 4 hr

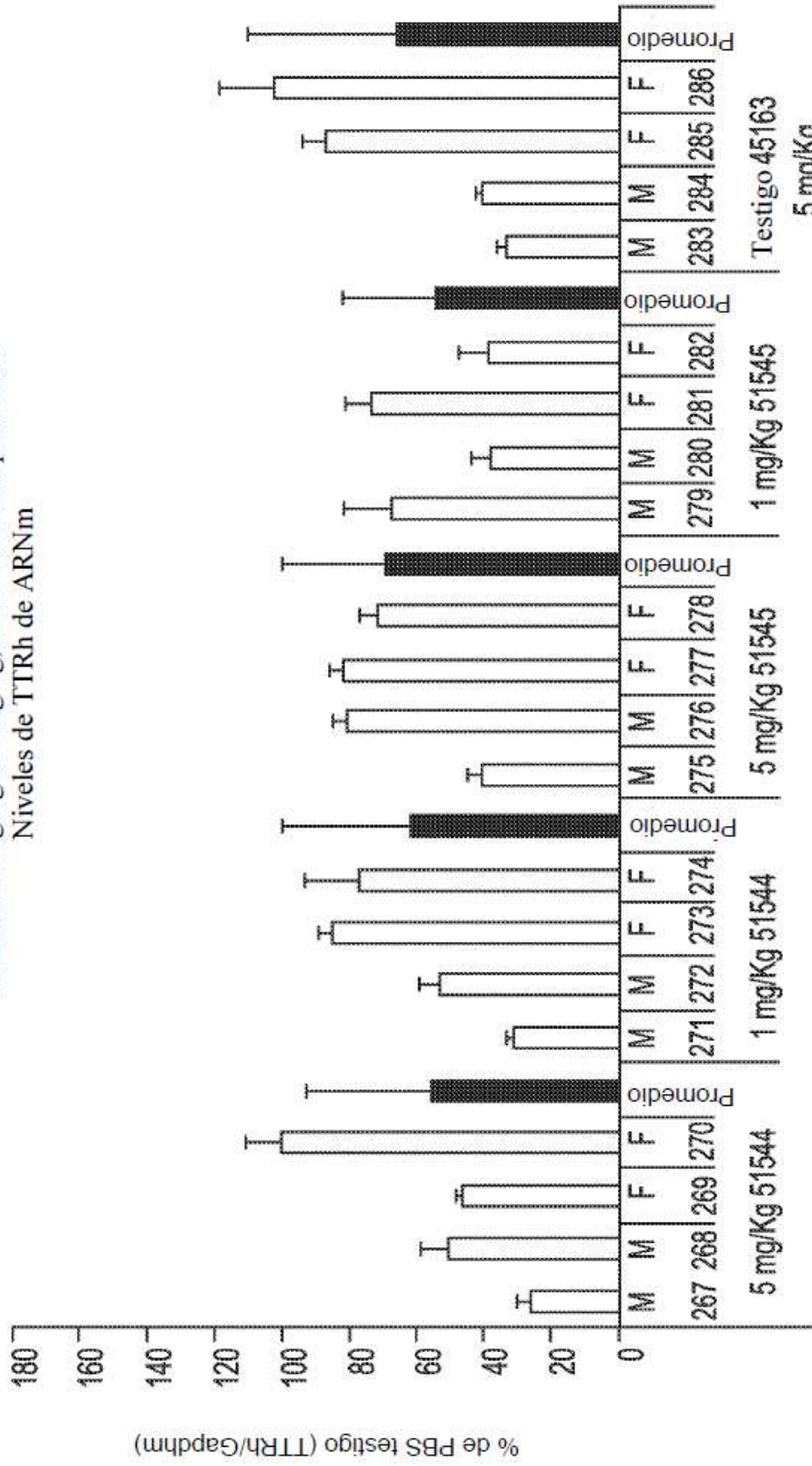
FIG. 9



- — 45165, Ajuste de 24 hr
- △ - - - 51546, Ajuste de 24 hr
- — 51547, Ajuste de 24 hr

FIG. 10A

Evaluación in vivo de candidato de conjugado de GaINAc3 de TTR humano/cynomolgus
 1x dosis a 5 mg/kg o 1 mg/kg, retiro 48 horas post dosis
 Niveles de TTRh de ARNm



AD-45136 Base

FIG. 10B

Evaluación in vivo de candidato de conjugado de GalNAc3 de TTR humano/cynomolgus
 Idosis a 5 mg/kg o 1 mg/kg, retro 48 horas post dosis
 Niveles de TTRh de ARNm

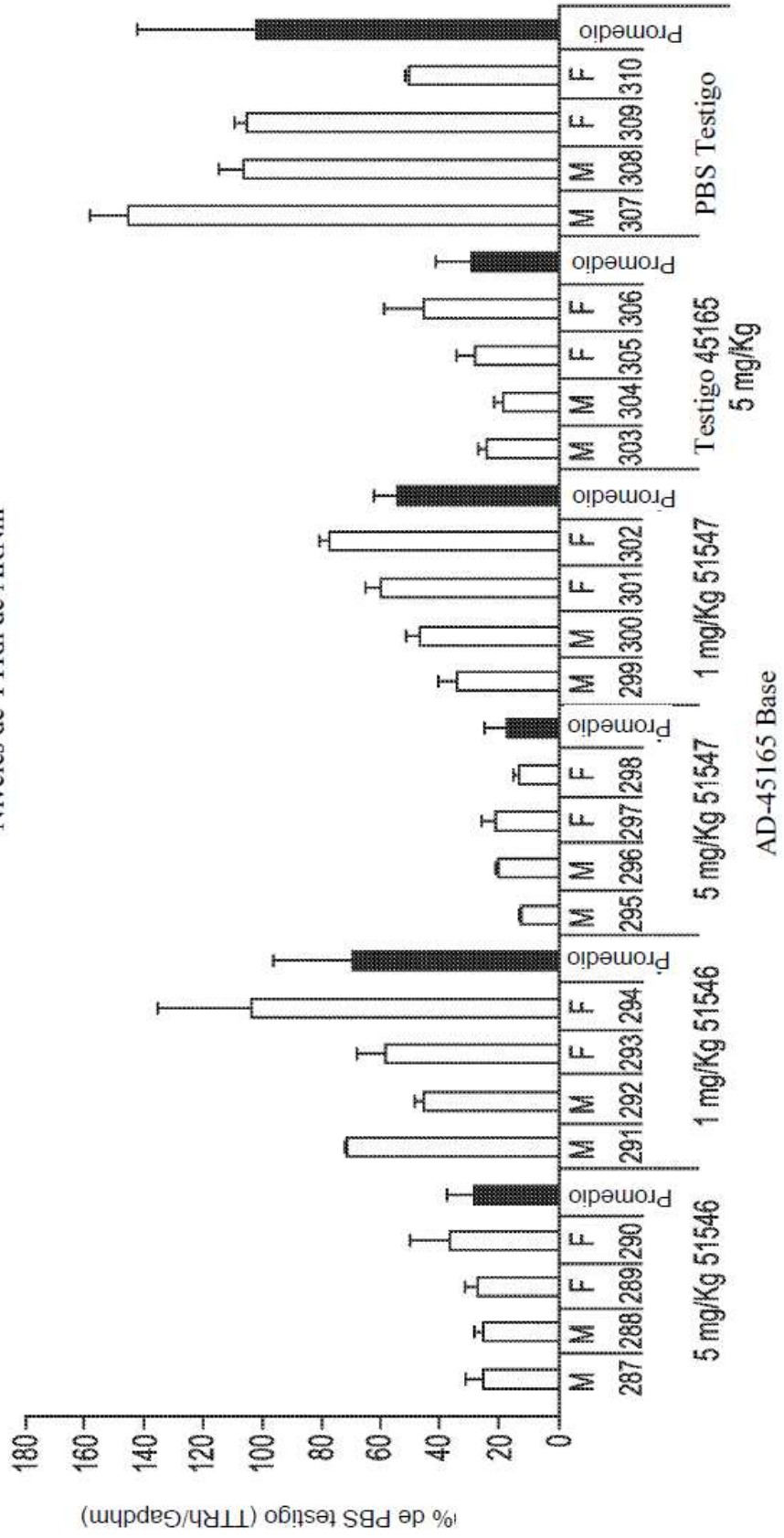


FIG. 11

Proteína TTR relativa - una sola dosis s.c., 48 h

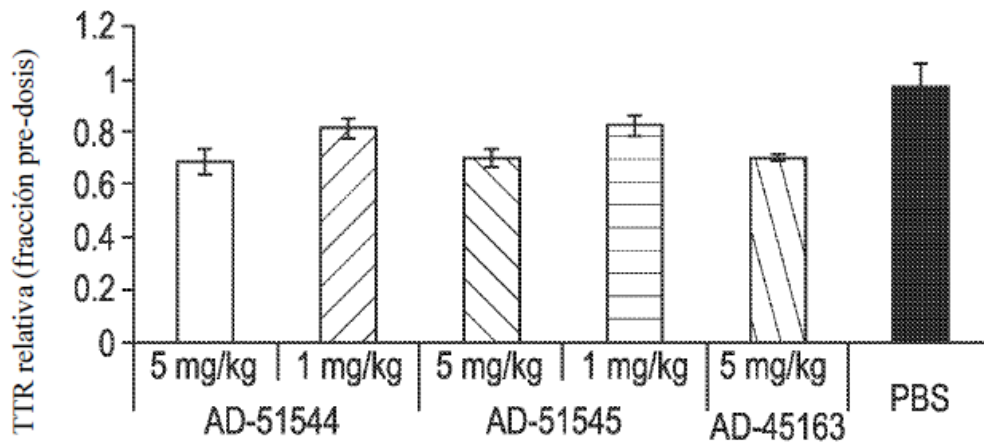


FIG. 12

Proteína TTR relativa - una sola dosis s.c., 48 h

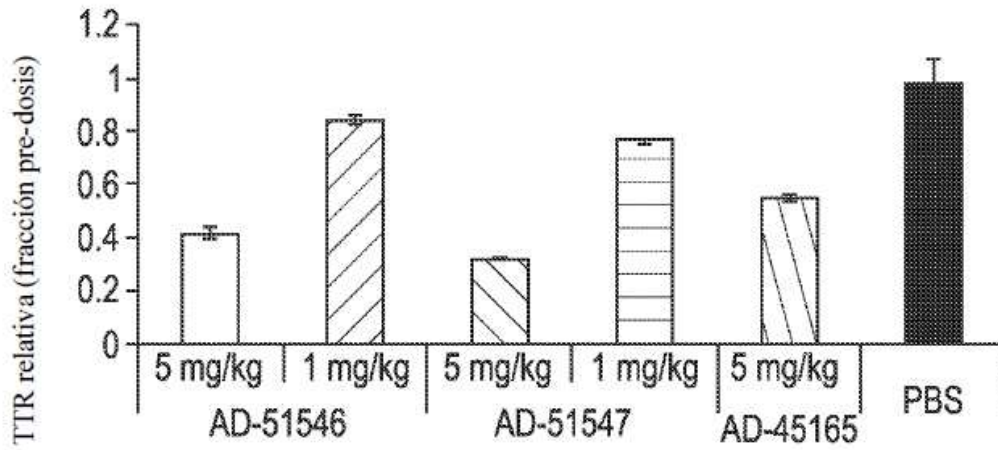


FIG. 13

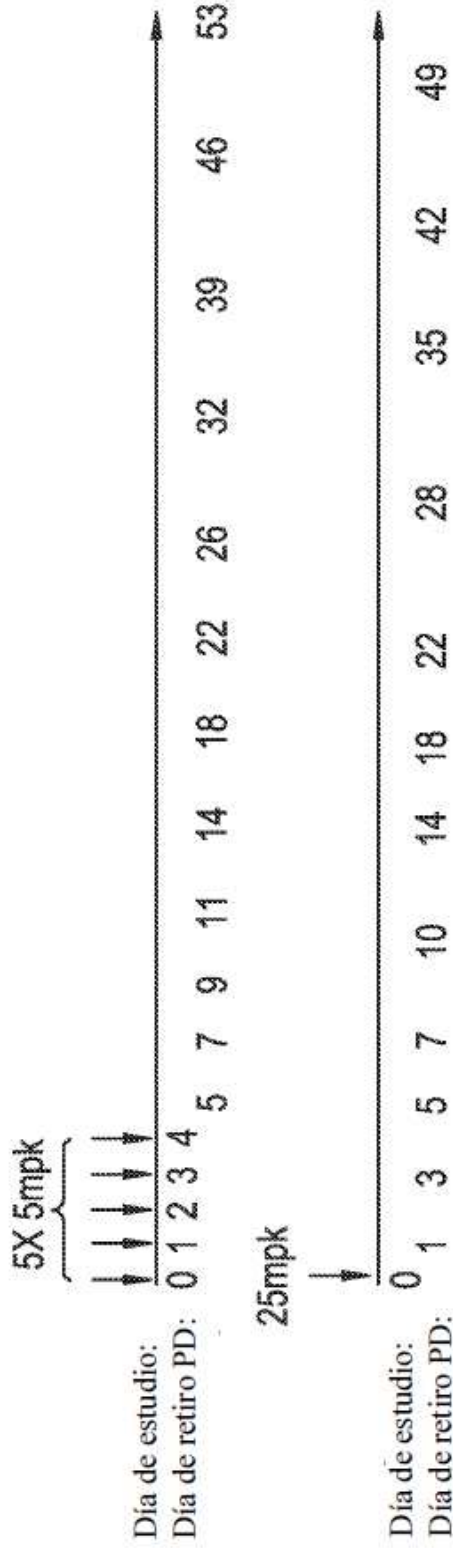
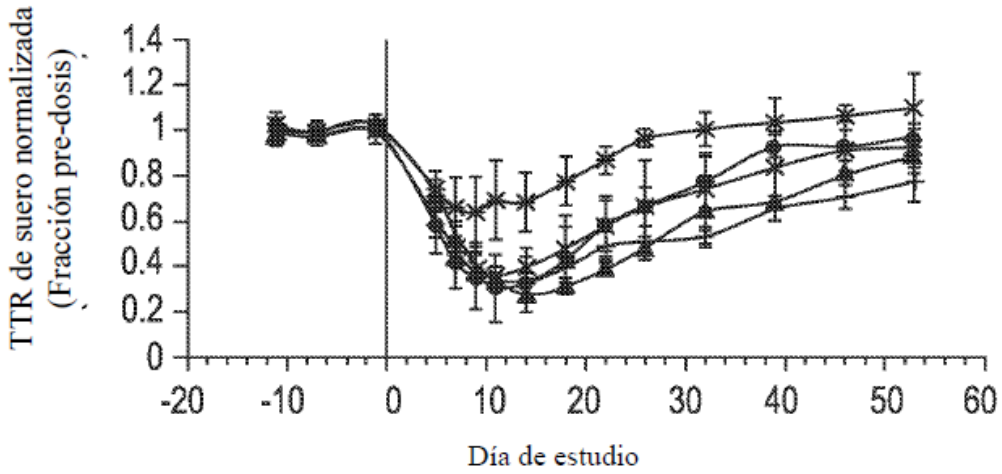


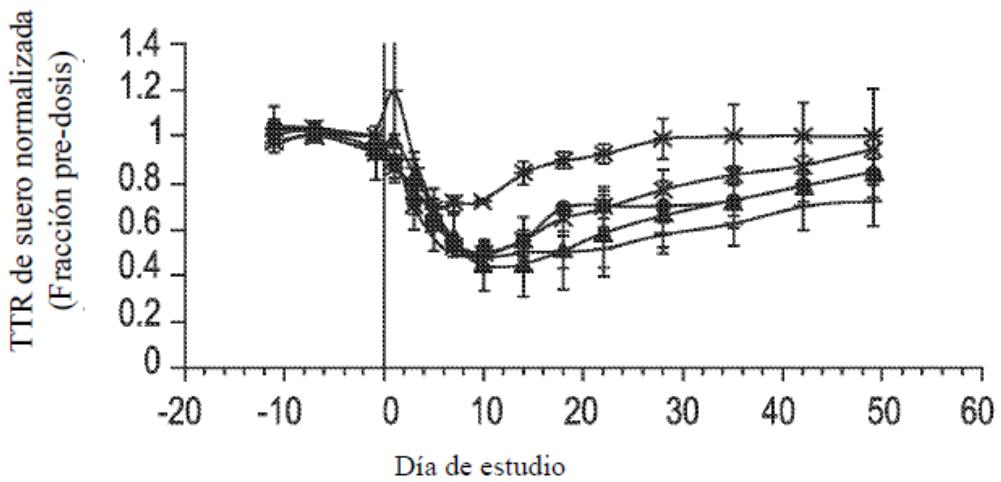
FIG. 14

5X 5mg/kg



- ▲ 5x5 mk 45163 × 5x5 mpk 51544 * 5x5 mpk 51545
- 5x5 mpk 51546 + 5x5 mpk 51547

25mg/kg



- ▲ 25mpk 45163 × 25mpk 51544 * 25mpk 51545
- 25mpk 51546 + 25mpk 51547

FIG. 15

