



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202126808 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：109132616

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 21 日

(51)Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01)

C12N15/85 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2019/09/20 中國大陸

201910891508.8

(71)申請人：大陸商中美瑞康核酸技術（南通）研究院有限公司（中國大陸） RACTIGEN THERAPEUTICS (CN)

中國大陸

(72)發明人：李 龍承 LI, LONGCHENG (US) ; 姜武林 KANG, MOORIM (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：13 共 108 頁

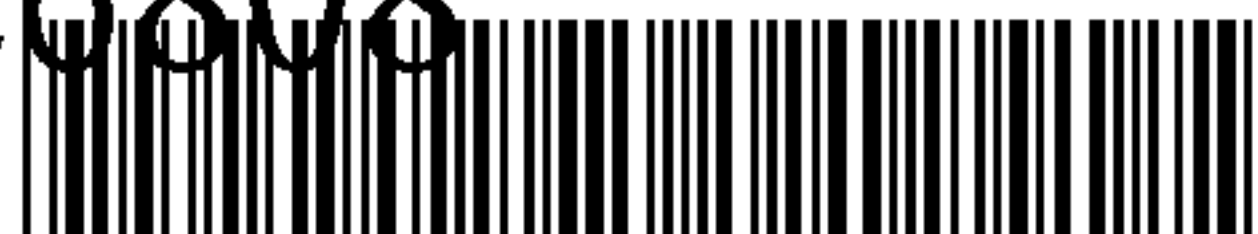
(54)名稱

用於治療血小板減少症的核酸分子及其應用

(57)摘要

本發明涉及小型活化核酸分子以及其在與 THPO 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況如血小板減少症治療中的應用。本案提供基於 RNA 激活機制的小型活化核酸分子，其可以是靶向 Thpo/THPO 基因啟動子區的雙股或單股 RNA 分子，包含第一核酸鏈和第二核酸鏈。靶向 Thpo/THPO 基因啟動子區的雙股 RNA 分子包含兩條長度為 16-35 個核苷酸的核酸鏈，並且其中一條核酸鏈與選自 Thpo/THPO 基因啟動子區的靶點存在至少 75% 的同源性或互補性。本發明也涉及包含該小型活化核酸分子的醫藥組成物或製劑；使用該小型活化核酸分子以及使用該醫藥組成物或製劑可以上調 Thpo/THPO 基因在細胞中的表現以及治療與 THPO 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況或因各種原因引起的血小板減少症的方法。

The present invention provides a small activating nucleic acid molecule and its application in the treatment of diseases or conditions related to THPO protein deficiency, such as thrombocytopenia. Based on RNA activation mechanism, the small activating nucleic acid molecule can be a double-stranded or single-stranded RNA molecule targeting the promoter region of Thpo/THPO gene, which comprises a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand. The double-stranded RNA molecule targeting Thpo/THPO gene promoter region comprises two nucleic acid strands with a length of 16-35 nucleotides, and one of the nucleic acid strands has at least 75% homology or complementarity to the target selected from the promoter region of Thpo/THPO gene. The present invention also relates to a pharmaceutical composition or preparation comprising the small activating nucleic acid molecule. The small activating nucleic acid molecule and the pharmaceutical composition or preparation can be used to up-regulate the expression of Thpo/THPO gene in cells and treat diseases or conditions related to THPO protein deficiency or thrombocytopenia caused by various reasons.



202126808

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於治療血小板減少症的核酸分子及其應用

【英文發明名稱】NUCLEIC ACID MOLECULE FOR TREATMENT OF
THROMBOCYTOPENIA AND THE APPLICATION
THEREOF

【中文】

本發明涉及小型活化核酸分子以及其在與THPO蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況如血小板減少症治療中的應用。本案提供基於RNA激活機制的小型活化核酸分子，其可以是靶向*Thpo/THPO*基因啟動子區的雙股或單股RNA分子，包含第一核酸鏈和第二核酸鏈。靶向*Thpo/THPO*基因啟動子區的雙股RNA分子包含兩條長度為16-35個核苷酸的核酸鏈，並且其中一條核酸鏈與選自*Thpo/THPO*基因啟動子區的靶點存在至少75%的同源性或互補性。本發明也涉及包含該小型活化核酸分子的醫藥組成物或製劑；使用該小型活化核酸分子以及使用該醫藥組成物或製劑可以上調*Thpo/THPO*基因在細胞中的表現以及治療與THPO蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況或因各種原因引起的血小板減少症的方法。

【英文】

The present invention provides a small activating nucleic acid molecule and its application in the treatment of diseases or conditions related to THPO protein deficiency, such as thrombocytopenia. Based on RNA activation mechanism, the small activating nucleic acid molecule can be a double-stranded or single-stranded RNA molecule targeting the promoter region of *Thpo/THPO* gene, which comprises a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand. The double-stranded RNA molecule targeting *Thpo/THPO* gene promoter region comprises two nucleic acid strands with a length of 16-35 nucleotides, and one of the nucleic acid strands has at

least 75% homology or complementarity to the target selected from the promoter region of Thpo/THPO gene. The present invention also relates to a pharmaceutical composition or preparation comprising the small activating nucleic acid molecule. The small activating nucleic acid molecule and the pharmaceutical composition or preparation can be used to up-regulate the expression of Thpo/THPO gene in cells and treat diseases or conditions related to THPO protein deficiency or thrombocytopenia caused by various reasons.

【指定代表圖】 圖

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於治療血小板減少症的核酸分子及其應用

【英文發明名稱】NUCLEIC ACID MOLECULE FOR TREATMENT OF
THROMBOCYTOPENIA AND THE APPLICATION
THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明屬於核酸技術領域，具體來講，涉及基因激活相關的雙股核酸分子，例如小型活化核酸分子，和小型活化核酸分子在激活/上調促血小板生成素（Thrombopoietin，*THPO*，*TPO*）基因轉錄中的應用，以及其在與 *THPO* 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或症狀，如血小板減少症治療中的應用。

【先前技術】

【0002】 血小板（thrombocyte）是周邊血液中的血液成分之一，衍生自骨髓中巨核細胞，無細胞核（Machlus, Thon, and Italiano 2014）。血小板的功能主要是促進止血和加速凝血，同時血小板還有維護毛細血管壁完整性的功能，在生理性止血和病理性血栓形成中起重要作用（Laki 1972）。

【0003】 血小板減少症是一種周邊血液中血小板數量異常減少的疾病，常見的臨床特點是皮膚瘀斑，黏膜出血或顱內出血，嚴重者會危及生命。採用血小板直接計數法顯示血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ 時，則認為患有血小板減少症（Kuter 2009）。血小板濃度低於 $50 \times 10^9/L$ 時，會頻繁出現自發性出血，表現為皮下紫癜。血小板濃度低於 $20 \times 10^9/L$ 時，患者會有生命危險，尤其是受到外傷或是突發性顱內出血、消化道大出血等會嚴重威脅患者的生命。

【0004】 血小板減少症按照發病機制可分為 3 類：骨髓生成血小板減少、周邊血液血小板破壞增加及脾臟扣留血小板（splenic

sequestration) (Seo et al. 2017)。導致血小板產生減少的原因包括先天性(遺傳性)和獲得性血小板減少症。目前的研究發現，至少 *MPL*、*GP1BA*、*GP1BB*、*GP9*、*MYH9*、*FLI1*、*NBEAL2*、*WAS*、*GATA1*、*PRKACG*、*GFI1b*、*STIM1*、*FYB*、*SLFN14*、*ETV6*、*DIAPH1* 和 *SRC* 等基因的突變可導致遺傳性血小板減少。獲得性因素導致的血小板減少症包括再生障礙性貧血 (aplastic anemia)、骨髓增生異常綜合症 (myelodysplastic syndromes)、白血病、藥物、感染、腫瘤疾病、放療、骨髓移植、慢性肝臟疾病等引起的血小板減少、免疫性血小板減少症 (immune thrombocytopenia, ITP)。導致血小板破壞過多的因素有血栓性血小板減少、肝素誘發的血小板減少、藥源性血小板減少、ITP 及血栓性血小板減少性紫癍 (thrombotic thrombocytopenia purpur, TPP) 等 (Hassan and Waller 2015)。脾臟增大扣留血小板及輸注血小板含量少的庫存血等也會引起血小板減少。

【0005】 促血小板生成素 (Thrombopoietin, THPO)，又稱巨核細胞生長和發育因子 (megakaryocyte growth and development factor, MGDF) 或 C-MPL 配體，是一種人體內由 *THPO* 基因編碼的類激素，其化學本質為糖蛋白，主要由肝臟和腎臟產生和分泌 (de Sauvage et al. 1994)。人體內的 *THPO* 基因位於第 3 號染色體長臂上 (3q26.3-3q27.2)，編碼含有 353 個胺基酸分子量為 36 kDa 的前體蛋白。在去除含 21 個胺基酸的信號肽後，剩餘的 332 個胺基酸經糖基化形成一個 95 kDa 的糖蛋白，隨後釋放到自體循環中，與其在巨核細胞及血小板上的 C-MPL 受體結合後刺激巨核細胞的形成和分化，進而促進血小板的生成 (Bartley et al. 1994)。小鼠 *Thpo* 基因 (亦稱 *Ml*、*Tpo*、*Mgdf*、*Mpllg*) 為人類 *THPO* 的同源性基因，編碼小鼠血小板生成素。C-MPL 最早是在感染了骨髓增生性白血病病毒 (MPLV) 的小鼠中發現，隨後人類 *C-MPL* 基因也被選殖 (Mignotte et al. 1994)。

【0006】 臨床治療血小板減少症的一線治療主要是藉由靜脈注射糖皮質激素 (大劑量的地塞米松 (dexamethasone) 或潑尼松 (prednisone)) 和丙種球蛋白 (IVIg)。若一線治療失敗或不能維持，

則選擇藥物治療或者脾臟切除等二線療法。但由於脾切除手術易感染，遠期復發，住院期延長，死亡風險高（Provan et al. 2010），藥物治療為目前常用的治療方法。

【0007】目前用於治療血小板減少症的藥物主要是促血小板生成藥，它們藉由補充或者模擬 THPO 的功能而刺激巨核細胞生長、成熟和產生血小板，主要包括兩類，即重組人類血小板生成素（rhTHPO）和 C-MPL 受體激動劑（C-MPL-RA）。早期與內源性 THPO 具有同源性的肽（第一代促血小板生成劑）在初期臨床試驗中對於血小板減少症患者有良好的效果，但是後期臨床試驗發現機體可產生與內源性 THPO 具有交叉反應的中和性抗體，導致持久性血小板減少（Basser 2002; Solberg 2005）。此外，由於體外重組的 THPO 無法完全糖基化，其促血小板生成功能有限。第二代促血小板生成劑主要為 C-MMPL-RA，包括 2008 年獲得 FDA 批准用於 ITP 的治療的艾曲波帕（Eltrombopag）和羅米司亭（Romiplostim）和 2018 年 FDA 獲批上市用於治療 ITP 的阿伐曲泊帕（Avatrombopag）。C-MPL 激動劑類藥物雖有一定的療效，但存在各種併發症及停藥反應。

【0008】雖然上述藉由補充 THPO 或者模擬其功能的促進血小板生成藥物在臨床治療上有一定的療效，但這些藥物存在一定的缺陷，均屬於二線治療藥物，而且主要用於 ITP 的治療。為了能夠有效治療各種原因導致的血小板減少症，還需要開發基於嶄新機制的治療方法。

【發明內容】

【0009】本發明的一個目標是提供基於 RNA 激活機制的小型活化核酸分子，其藉由激活/上調 THPO 基因轉錄，增加 THPO 蛋白的表現量來促進血小板生成，或者治療與 THPO 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況或因各種原因引起的血小板減少症，如藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症等。

【0010】本發明的另一目標是提供包含小型活化核酸分子的組成物或製劑。

【0011】 本發明的又一目標為提供小型活化核酸分子或包含其的組成物或製劑在製備用於激活/上調 *THPO* 基因在細胞中的表現的藥物中的應用。

【0012】 本發明的又一目標為提供激活/上調 *Thpo/THPO* 基因在細胞中的表現的方法。

【0013】 本發明的再一目標為提供小型活化核酸分子或包含其的組成物或製劑在製備用於治療血小板減少症和/或與 *THPO* 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況的藥物中的應用或治療血小板減少症和/或與 *THPO* 蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況的方法。

【0014】 本發明的另一目標為提供分離的 *Thpo/THPO* 基因小型活化核酸分子靶位點，其中該靶位點包括或選自 SEQ ID NO:2 至 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:601 至 SEQ ID NO:605 中任一序列上的任意連續 16-35 個核苷酸的序列或與上述任意連續 16-35 個核苷酸組成的序列具有至少 75%同源性的序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或 100%同源性的序列。

【0015】 技術方案

【0016】 在本發明的一個方面，提供了小型活化核酸分子例如小型活化 RNA（small activating RNA，saRNA）分子，其激活或者上調小鼠細胞中 *Thpo* 基因的表現，該小型活化核酸分子的一條鏈與小鼠 *Thpo* 基因啟動子區的任一長度為 16-35 個核苷酸的核酸序列具有至少 75%的同源性或互補性，啟動子區是指包括轉錄起始位點上游的 500 個核苷酸，從而實現該基因表現的激活或者上調。具體而言，小型活化核酸分子的一條鏈包括或選自與 *Thpo* 基因啟動子中距轉錄起始位點上游的-493 至-356 區域（熱點 1，SEQ ID NO:2）、-273 至-183 區域（熱點 2，SEQ ID NO:3）或-164 至-80 區域（熱點 3，SEQ ID NO:4）中的連續 16-35 個核苷酸具有至少 75%同源性或互補性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或 100%同源性或互補性的核酸序列。更具體地，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈與選自 SEQ ID NO:200 至 SEQ ID NO:296 的任一核苷酸序

列具有至少 75% 同源性或互補性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同源性或互補性。在一個具體的實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈包括與選自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75% 同源性或互補性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同源性或互補性的核酸序列。在另一實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈由與選自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75%（例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100%）的同源性或互補性的核酸序列組成。在另一實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈是與選自 SEQ ID NO：200 至 SEQ ID NO：296 的任一核苷酸序列具有至少 75% 同源性或互補性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同源性或互補性的核酸序列。

【0017】 本發明的小型活化核酸分子包括靶向小鼠 *Thpo* 基因啟動子區的雙股小型活化核酸分子，例如小型活化 RNA（saRNA）分子，其包含第一核酸鏈和第二核酸鏈，第一核酸鏈與 *Thpo* 基因啟動子中距轉錄起始位點-493 至-356 區域（熱點 1，SEQ ID NO:2）、-273 至-183 區域（熱點 2，SEQ ID NO:3）或-164 至-80（熱點 3，SEQ ID NO:4）中的任一連續 16-35 個核苷酸具有至少 75% 同源性或互補性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同源性或互補性，第一核酸鏈和第二核酸鏈能藉由互補形成雙股核酸結構，雙股核酸結構能夠激活 *Thpo* 基因在細胞中的表現。

【0018】 在本發明的另一個方面，提供了小型活化核酸分子例如小型活化 RNA（small activating RNA，saRNA）分子，其激活或者上調人類細胞中 *THPO* 基因的表現，該小型活化核酸分子的一條鏈與人類 *THPO* 基因啟動子區的任一長度為 16-35 個核苷酸的核酸序列具有至少 75% 的同源性或互補性，啟動子區是指包括轉錄起始位點上游的 500 個核苷酸，從而實現該基因表現的激活或者上調。具體而言，小型

活化核酸分子的一條鏈包括或選自與 *THPO* 基因啟動子中距轉錄起始位點上游的-1339 至-1044 區域（熱點 1，SEQ ID NO:601）、-1027 至-903 區域（熱點 2，SEQ ID NO:602）、-861 至-754 區域（熱點 3，SEQ ID NO:603）、-728 至-611 區域（熱點 4，SEQ ID NO:604）或-593 至-1 區域（熱點 5，SEQ ID NO:605）中的連續 16-35 個核苷酸具有至少 75%，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或 100%的同源性或互補性的核酸序列。更具體地，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈與選自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%同源性或互補性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同源性或互補性。在一個具體的實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈包括與選自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%同源性或互補性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同源性或互補性的核酸序列。在另一實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈由與選自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%同源性或互補性的核酸序列組成，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同源性或互補性的核酸序列組成。在還一實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的一條鏈是與選自 SEQ ID NO：606 至 SEQ ID NO：1047 的任一核苷酸序列具有至少 75%同源性或互補性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同源性或互補性的核酸序列。

【0019】 本發明的小型活化核酸分子包括靶向人類 *THPO* 基因啟動子區的雙股小型活化核酸分子例如小型活化 RNA（saRNA）分子，其包含第一核酸鏈和第二核酸鏈，第一核酸鏈與 *THPO* 基因啟動子中距轉錄起始位點-1339 至-1044 區域（熱點 1，SEQ ID NO:601）、-1027 至-903 區域（熱點 2，SEQ ID NO:602）、-861 至-754 區域（熱點 3，SEQ ID NO:603）、-728 至-611 區域（熱點 4，SEQ ID NO:604）

或-593 至-1（熱點 5，SEQ ID NO:605）中的任一連續 16-35 個核苷酸具有至少 75%同源性或互補性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同源性或互補性，第一核酸鏈和第二核酸鏈能藉由互補形成雙股核酸結構，雙股核酸結構能夠激活人類 *THPO* 基因在細胞中的表現。

【0020】 本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈和第二核酸鏈可存在於兩條不同的核酸鏈上，也可存在於同一條核酸鏈上。當第一核酸鏈和第二核酸鏈分別位於兩條鏈上時，小型活化核酸分子的至少一條鏈可在 5'端和/或 3'端具有突出或懸垂，例如在 3'端可具有 0-6 個核苷酸的突出，如，0、1、2、3、4、5 或 6 個核苷酸的突出。較佳地，本發明的小型活化核酸分子的兩條鏈都具有突出，更佳地，小型活化核酸分子的兩條鏈的 3'端均可以具有 0-6 個核苷酸的突出，例如，具有 0、1、2、3、4、5 或 6 個核苷酸的突出，最佳地，具有 2 個或 3 個核苷酸的突出。較佳地，突出端的核苷酸可以是 dT。

【0021】 本發明的小型活化核酸分子也可包括可形成雙股區髮夾結構的小型活化核酸分子，例如單股小型活化 RNA 分子。在一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子包括靶向 *THPO* 基因啟動子區的單股小型活化 RNA 分子，其中該單股小型活化核酸分子可形成雙股區髮夾結構。當第一核酸鏈和第二核酸鏈存在於同一條核酸鏈上時，較佳地，本發明的小型活化核酸分子可以為髮夾型單股核酸分子，其中第一核酸鏈和第二核酸鏈具有能形成雙股核酸結構的互補區域，該雙股核酸結構可藉由例如 RNA 激活機制促進 *THPO* 基因在細胞中的表現。

【0022】 上述小型活化核酸分子中，第一核酸鏈和第二核酸鏈的長度可以分別為 16-35 個核苷酸，例如，可以為 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 個核苷酸。

【0023】 在一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈與選自 SEQ ID NO：6-102 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、

約 99%或約 100%的同一性或同源性，且小型活化核酸分子的第二核酸鏈與選自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性。在一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈包括與選自 SEQ ID NO：6-102 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由與選自 SEQ ID NO：6-142 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性的核酸序列組成，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性的核酸序列組成，並且本發明的小型活化核酸分子的第二核酸鏈包括與選自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性的核酸序列，或者由與選自 SEQ ID NO：103-199 中的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性的核酸序列組成。在具體的實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈可包括或選自 SEQ ID NO：6-102 的任一核苷酸序列，並且其第二鏈可以包括或選自 SEQ ID NO：103-199 的任一核苷酸序列。在一個實施方式中，本文該的小型活化核酸分子可以是合成的、活體外轉錄的或者載體表現的。

【0024】 在另一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈與選自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性，並且小型活化核酸分子的第二核酸鏈與選自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75%同一性或同源性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%的同一性或同源性。在一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第

一核酸鏈包括與選自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75% 同一性或同源性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同一性或同源性的核酸序列，或者由與選自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 中的任一核苷酸序列具有至少 75% 同一性或同源性的核酸序列組成，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同一性或同源性的核酸序列組成，並且本發明的小型活化核酸分子的第二核酸鏈包括與選自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75% 同一性或同源性的核酸序列，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同一性或同源性的核酸序列，或者由與選自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 中的任一核苷酸序列具有至少 75% 同一性或同源性的核酸序列組成，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99% 或約 100% 的同一性或同源性的核酸序列組成。在具體的實施方式中，本發明的小型活化核酸分子的第一核酸鏈可以包括或選自 SEQ ID NO：1048 至 SEQ ID NO：1489 的任一核苷酸序列，並且其第二鏈可以包括或選自 SEQ ID NO：1490 至 SEQ ID NO：1931 的任一核苷酸序列。在一個實施方式中，本文所述的小型活化核酸分子可以是合成的、體外轉錄的或者載體表現的。

【0025】 本文所述小型活化核酸分子中所有的核苷酸都可為天然的未經化學修飾的核苷酸，也可包括至少一種修飾。在一個實施方式中，本文所述的小型活化核酸分子中的修飾可包括化學修飾，如在至少一個核苷酸可具有化學修飾，本發明使用的化學修飾可以包括或選自如下修飾中的一種或多種，或其任意組合：

- (1) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯鍵的修飾；
- (2) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的核糖的 2'-OH 的修飾；
- (3) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的鹼基的修飾；

(4) 該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的至少一個核苷酸為鎖核酸。

【0026】 該化學修飾為本領域技術人員所公知，該磷酸二酯鍵的修飾是指對磷酸二酯鍵中的氧進行修飾，包括但不限於，硫代磷酸修飾和硼烷化磷酸鹽修飾。兩種修飾都能穩定 saRNA 結構，保持鹼基配對的高特異性和高親和力。

【0027】 核糖修飾是指對核苷酸戊糖中 2'-OH 的修飾，即，在核糖的羥基位置引入某些取代基，例如，包括但不限於，2'-氟代修飾、2'-氧甲基修飾、2'-氧亞乙基甲氧基修飾、2,4'-二硝基苯酚修飾、鎖核酸 (LNA)、2'-胺基修飾、2'-脫氧修飾等。

【0028】 鹼基修飾是指對核苷酸的鹼基進行修飾，例如，包括但不限於，5'-溴尿嘧啶修飾、5'-碘尿嘧啶修飾、N-甲基脲嘧啶修飾、2,6-二胺基嘌呤修飾等。

【0029】 這些修飾可增加小型活化核酸分子的生物可利用性，提高與靶序列的親和性，增強在細胞內抵抗核酸酶水解的能力。

【0030】 此外，為了促進小型活化核酸分子進入細胞，可在以上修飾的基礎上，在小型活化核酸分子的第一核酸鏈和/或第二核酸鏈的末端引入例如膽固醇等親脂性基團以利於通過由脂質雙分子層構成的細胞膜及核膜與細胞核內的基因啟動子區發生作用。

【0031】 本發明提供的小型活化核酸分子在與細胞接觸或引入細胞後可有效激活或上調細胞中 *Thpo/THPO* 基因的表現，較佳情況下表現至少上調 10%。

【0032】 本發明的另一方面還涉及編碼本文所述的小型活化核酸分子的核酸。在一個實施方式中，該核酸可為 DNA 分子。

【0033】 在本發明的另一方面，提供包含上文所述的小型活化核酸分子或編碼本文所述的小型活化核酸分子的核酸的細胞。在一個實施方式中，本發明的小型活化核酸分子可為靶向 *Thpo/THPO* 基因啟動子區的雙股小型活化核酸分子，例如雙股小型活化 RNA (saRNA) 分子，其包括第一核酸鏈和第二核酸鏈。在另一實施方式中，本發明的小型活

化核酸分子可為靶向 *Thpo/THPO* 基因啟動子區的單股小型活化核酸分子，例如髮夾結構的單股核酸，該髮夾結構的單股核酸可在導入細胞後在細胞內產生雙股小型活化 RNA (saRNA) 分子。

【0034】 本發明的另一方面提供組成物（例如醫藥組成物），該組成物包含本發明所述的小型活化核酸分子或編碼本文所述的小型活化核酸分子的核酸及可選擇地藥學上可接受的載劑。在一個實施方式中，該藥學上可接受的載劑可包括或選自脂質體、高分子聚合物或多肽。

【0035】 在本發明的另一方面，提供一種製劑，該製劑包括：本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明所述的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子之核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物。

【0036】 在本發明的另一方面，提供一種套組，該套組包括：本發明的小型活化核酸分子、編碼本文所述的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物。

【0037】 本發明的另一方面涉及本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物在製備用於激活/上調 *Thpo/THPO* 基因在細胞中的表現的藥物或製劑中的應用。

【0038】 本發明的另一方面還涉及激活/上調 *Thpo/THPO* 基因在細胞中的表現的方法，該方法包括給該細胞施用本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物或製劑。在一個實施方式中，激活/上調 *Thpo/THPO* 基因在細胞中的表現的方法包括給該細胞施用本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物。上述細胞包括哺乳動物細胞，例如來自人體或小鼠的細胞，如人類胚肝細胞、人類肝癌細胞如 HepG2 細胞、人類肝細胞、如小鼠胚胎肝細胞如胚肝細胞系 BNL.CL2、小鼠

肝癌細胞如肝癌細胞系 LPC-H12-和小鼠原代肝細胞等，上述細胞可以是離體的，也可存在於哺乳動物體中，如小鼠或人體中。

【0039】 本發明的小型活化核酸分子可被直接導入細胞中，也可將編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸序列導入細胞後在細胞內產生；該細胞較佳為哺乳動物細胞，更佳為小鼠或人類細胞。上述細胞可以是離體的，如細胞系或細胞株等，也可存在於哺乳動物體中，如小鼠或人體中，更具體地，例如小鼠或人體的肝細胞中。人體可以是具有與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病或症狀的患者，亦可為各種因素所致的血小板減少症患者。本發明所述的小型活化核酸分子可被施以足夠的量以實現對與 THPO 蛋白量的缺乏或與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病或症狀的治療。具體情況下，該與 THPO 蛋白量的缺乏或與 THPO 表現不足或減少相關的疾病或症狀可包括例如血小板減少症等。

【0040】 本發明另一方面提供了分離的 *Thpo/THPO* 基因小型活化核酸分子作用位點，該位點具有 *Thpo/THPO* 基因的啟動子區上任意連續的 16-35 個核苷酸的序列，較佳情況下，該作用位點包括或選自 SEQ ID NO：2-4 和 SEQ ID NO：601-605 中的任一條序列上的任意連續 16-35 個核苷酸的序列。具體而言，該作用位點可以包括或選自 SEQ ID NO：200-296 和 SEQ ID NO：606-1047 中的任一核苷酸序列。

【0041】 本發明的另一方面涉及治療個體（如人類或小鼠個體）中與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病或狀況或血小板減少症的方法，包括給該個體施用治療有效量的本發明的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物。在一個實施方式中，本發明的治療個體中血小板減少症和/或與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病或狀況的方法可包括給個體施用治療有效量的本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化

核酸分子的組成物和治療有效量的其它藥劑，該其它藥劑包括例如小分子化合物、抗體、多肽、蛋白等。該個體可為哺乳動物，包括例如小鼠或人類。本發明中，血小板減少症包括由各種因素所致的血小板減少症，例如，包括但不限於，骨髓生成血小板減少、周邊血液血小板破壞增加及脾臟扣留血小板（splenic sequestration）。導致血小板產生減少的因素包括先天性（遺傳性）和獲得性血小板減少症。在一個實施方式中，導致獲得性血小板減少症的因素包括但不限於，再生障礙性貧血（aplastic anemia）、骨髓增生異常綜合症（myelodysplastic syndromes）、白血病、藥物、感染、腫瘤疾病、放療、骨髓移植、慢性肝臟疾病等引起的血小板減少，免疫性血小板減少症（immune thrombocytopenia, ITP）。導致血小板破壞過多的因素包括但不限於，血栓性血小板減少、肝素誘發的血小板減少、藥源性血小板減少、ITP及血栓性血小板減少性紫癜。在一個實施方案中，血小板減少症與THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病或狀況相關。在另一個實施方案中，血小板減少症與THPO 蛋白表現不足或減少不相關。血小板減少症包括藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癜等。本文所述的血小板減少症可以由於各種原因所致，例如在骨髓中血小板生成減少，周邊血液中破壞過多或者脾臟增大扣留血小板，例如腫瘤放療、腫瘤化療、骨髓移植、慢性肝臟疾病、藥源性血小板減少症、免疫性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫癜、遺傳性血小板減少症等。血小板減少症常見的臨床特點是皮膚瘀斑，骨髓中巨核細胞改變，黏膜出血或顱內出血，嚴重者會危及生命。採用血小板直接計數法顯示血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ 時，則認為患有血小板減少症（Kuter 2009）。血小板濃度低於 $50 \times 10^9/L$ 時，會頻繁的出現自發性出血，最常見的就是皮下紫癜。血小板濃度低於 $20 \times 10^9/L$ 時，患者就會變得極其危險，尤其是受到外傷或是突發性顱內出血、消化道大出血等會嚴重威脅到患者的生命。在本發明的方法中，該個體中的血小板減少症的特徵可以是在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ ，低於 $50 \times 10^9/L$ 或低於 $20 \times 10^9/L$ 。在一個實施方式中，個體中THPO 蛋

白表現不足或減少相關的疾病或狀況在施用治療有效量的本發明的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物之後得到緩解、減輕或治癒。

【0042】 本發明的另一方面涉及治療個體中的血小板減少症的方法，包括給該個體施用治療有效量的本發明的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物。在本發明的方法中，該個體中的血小板減少症的特徵可以是在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ ，低於 $50 \times 10^9/L$ 或者低於 $20 \times 10^9/L$ 。在本發明的方法中，血小板減少症可包括與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症、藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癜等。本文所述的血小板減少症可由於各種原因所致的在骨髓中血小板生成減少，周邊血液中破壞過多或者脾臟增大扣留血小板，例如腫瘤放療、腫瘤化療、骨髓移植、慢性肝臟疾病、藥源性血小板減少症、免疫性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫癜、遺傳性血小板減少症等。在一個實施方式中，本發明的治療血小板減少症的方法包括給個體施用治療有效量的本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物和/或上述小型活化核酸分子、編碼上述小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、包含本發明的小型活化核酸分子的組成物與治療有效量的其它製劑組成的組成物，該其它製劑包括例如小分子化合物、抗體、多肽、蛋白等。該個體可以是哺乳動物，包括例如小鼠或人類。在上述方法中，血小板減少症可包括藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癜等。在上述方法中，個體包括哺乳動物，例如鼠

和人類。在一個實施方式中，個體中的血小板減少症在施用治療有效量的本發明的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物之後得到緩解、減輕或治癒。較佳地，該緩解、減輕或治癒可以是在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度得到提高或恢復到接近正常生理水平如在 $100 \times 10^9/L$ 至 $300 \times 10^9/L$ 的範圍內。

【0043】 本發明的另一方面涉及本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物在製備用於治療血小板減少症和/或與 **THPO** 蛋白表現不足或減少相關的疾病或狀況的藥物中的應用。該個體可以是哺乳動物，例如人類。在本發明的應用中，血小板減少症包括由各種因素所致的血小板減少症，例如，包括但不限於，骨髓生成血小板減少、周邊血液血小板破壞增加及脾臟扣留血小板 (**splenic sequestration**)。導致血小板產生減少的因素包括先天性（遺傳性）和獲得性血小板減少症。在一個實施方式中，導致獲得性血小板減少症的因素包括但不限於，再生障礙性貧血 (**aplastic anemia**)、骨髓增生異常綜合症 (**myelodysplastic syndromes**)、白血病、藥物、感染、腫瘤疾病、放療、骨髓移植、慢性肝臟疾病等引起的血小板減少，免疫性血小板減少症 (**immune thrombocytopenia, ITP**)。導致血小板破壞過多的因素包括但不限於，血栓性血小板減少、肝素誘發的血小板減少、藥源性血小板減少、**ITP** 及血栓性血小板減少性紫癜。在一個實施方式中，血小板減少症可包括例如與 **THPO** 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症。較佳地，血小板減少症可包括或選自與 **THPO** 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症、藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癜等。本文所述的血小板減少症可由於各種原因導致的血小板消耗增加等引起，例如腫瘤放療、腫瘤化療、骨髓移植、慢性肝臟疾病、患者脾臟增大扣留血小板、輸注血小板含量少的庫存血

和藥物。在一個實施方式中，血小板減少症可表現為在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ ，低於 $50 \times 10^9/L$ 或者低於 $20 \times 10^9/L$ 。

【0044】 在一個施方式中，提供了本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物可以用於製備治療血小板減少症和/或與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的疾病的藥物。在一個實施方案中，血小板減少症可以包括與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症，較佳地，血小板減少症可包括藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癍等。在一個實施方式中，血小板減少症可以表現為在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ ，低於 $50 \times 10^9/L$ 或者低於 $20 \times 10^9/L$ 。

【0045】 本發明的另一方面涉及本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物或製劑在製備用於治療血小板減少症的藥物或藥物組合中的應用。較佳地，血小板減少症可包括或選自與 THPO 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症或者其他各種原因所致的血小板減少症，如藥物源性血小板減少症、免疫性血小板減少症和血栓性血小板減少性紫癍等。本文所述的血小板減少症可由於各種原因例如腫瘤放療、腫瘤化療、骨髓移植、慢性肝臟疾病、患者脾臟增大扣留血小板、輸注血小板含量少的庫存血和藥物導致的血小板消耗增加等引起。在一個實施方式中，血小板減少症可表現為在血小板直接計數法顯示時，血小板濃度低於 $100 \times 10^9/L$ ，低於 $50 \times 10^9/L$ 或者低於 $20 \times 10^9/L$ 。

【0046】 在一個實施方式中，提供了本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、包含本發明的小型活化核酸分子或編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸的細胞、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物或製劑在製備用於治療與 THPO 蛋白表

現不足或減少相關的疾病或血小板減少症的藥物或藥物組合中的應用。

【0047】 本發明的有益效果

【0048】 本發明提供的能夠激活/上調內源性 *Thpo/THPO* 基因表現的小型活化核酸分子，例如小型活化 RNA (saRNA)，能夠特異地激活 *Thpo/THPO* 基因，上調或恢復 *Thpo/THPO* 基因和蛋白的表現並同時具有較低的毒副作用，可用於治療由於 *Thpo/THPO* 蛋白表現不足及各種原因所致的血小板產生不足或者破壞過多而引起的血小板減少症，或者製備用於治療血小板減少症的藥物或製劑。

【圖式簡單說明】

【0049】

圖 1 為小鼠 *Thpo* saRNA 介導的小鼠 *Thpo* mRNA 表現改變。靶向小鼠 *Thpo* 啟動子的 322 個 saRNA 以 10 nM 終濃度轉染 BNL.CL2 細胞，轉染 72 小時後用單步驟 RT-qPCR 分析 *Thpo* mRNA 表現。圖示為相對於對照處理 (Mock) 的 *Thpo* 的 mRNA 表現改變 ($\log_2$) 從最高到最低排序。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 2 為小鼠 *Thpo* saRNA 在小鼠 *Thpo* 啟動子上的熱點區域。靶向小鼠 *Thpo* 啟動子的 322 個 saRNA 以 10 nM 終濃度轉染 BNL.CL2 細胞 72 小時，轉染結束後用單步驟 RT-qPCR 分析 *Thpo* mRNA 表現。圖示為相對於對照處理 (Mock) 的 *Thpo* 表現改變，按照 saRNA 在 *Thpo* 啟動子上的靶點位置從 -500 到 -0 排序。黑色實心點表示功能性 saRNA，白色空心點表示非功能性 saRNA，虛線條框示 3 個功能性 saRNA 聚集的熱點區 (H1~H3)。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值。

圖 3 為二步驟法 RT-qPCR 驗證小鼠 *Thpo* saRNA HTS 篩選結果。用圖 3 所示 saRNA 以 10 nM 終濃度轉染 BNL.CL2 細胞 72 小時，轉染結束後用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後用 ABI 7500 快速即時 PCR 系統進行 qPCR 擴增，同時擴增 *Tbp* 基因作為內部參考。圖示為單個 saRNA 處理細胞後 *Thpo* mRNA 的相對表現值。Mock、

dsCon2 和 DS03-432i 分別為空白轉染、無關序列雙股 RNA 轉染及短小干擾 RNA 對照轉染。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 4 為二步驟法 RT-qPCR 驗證小鼠 *Thpo* saRNA HTS 篩選結果。用圖 4 所示 saRNA 以 10 nM 終濃度轉染 LPC-H12 細胞 72 小時，轉染結束後用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後用 ABI 7500 快速即時 PCR 系統進行 qPCR 擴增，同時擴增 *Tbp* 基因作為內部參考。圖示為單個 saRNA 處理細胞後 *Thpo* mRNA 的相對表現值。Mock、dsCon2 和 DS03-432i 分別為空白轉染、無關序列雙股 RNA 轉染及短小干擾 RNA 對照轉染。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 5 為二步驟法 RT-qPCR 在原代小鼠肝細胞中驗證小鼠 *Thpo* saRNA HTS 篩選結果。用圖 5 所示 saRNA 以 10 nM 終濃度轉染原代小鼠肝細胞 72 小時，轉染結束後用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後用 ABI 7500 快速即時 PCR 系統進行 qPCR 擴增，同時擴增 *Tbp* 基因作為內部參考。圖示為單個 saRNA 處理細胞後 *Thpo* mRNA 的相對表現值。Mock、dsCon2 和 DS03-432i 分別為空白轉染、無關序列雙股 RNA 轉染及短小干擾 RNA 對照轉染。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 6 為小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 *Thpo* 的濃度。雄性 *Balb/c* 小鼠 15 隻，隨機分成 3 組，每組 5 隻，分別接受尾靜脈注射 PBS，LNP 包載的 *Thpo*-siRNA（DS03-432i，5 mg/kg）和 LNP 包載的 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，5 mg/kg），72 小時後收集血樣並分離血清，用小鼠 *Thpo* ELISA 套組檢測小鼠血清中 *Thpo* 蛋白含量。PBS 和 DS03-432i 分別為空白對照和短小干擾 RNA 對照。*** $P < 0.001$ 。

圖 7 為小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 *Thpo* 的濃度。雄性 *Balb/c* 小鼠 32 隻，隨機分成 4 組，每組 8 隻，分別接受尾靜脈注射 PBS 和 LNP 包載的 DS03-0024（1 mg/kg，3 mg/kg 和 6 mg/kg），給藥前一天和給藥後 2 天分別收集血樣並分離血清，用小鼠 *Thpo* ELISA 套組檢測小鼠血清中 *Thpo* 蛋白含量。**** $P < 0.0001$ 。

圖 8 為小鼠 *Thpo* saRNA 增加小鼠血小板數量。雄性 *Balb/c* 小

鼠 32 隻，隨機分成 4 組，每組 8 隻，分別接受尾靜脈注射 PBS 和 LNP 包載的 DS03-0024 (1 mg/kg, 3 mg/kg 和 6 mg/kg)，給藥 6 天後收集血液樣本，用小鼠周邊血液血小板分離套組收集血小板，以 CD41a-FITC 抗體特異性標記血小板，並用流式細胞儀計數。 $*P < 0.05$ 。

圖 9 為小鼠 *Thpo* saRNA 在給藥 9 天引起的小鼠血小板數量改變。雄性 Balb/c 小鼠 32 隻，隨機分成 4 組，每組 8 隻，分別接受尾靜脈注射 PBS 和 LNP 包載的 DS03-0024 (1 mg/kg, 3 mg/kg 和 6 mg/kg)，給藥 17 天後收集血樣用小鼠周邊血液血小板分離套組收集血小板，以 CD41a-FITC 抗體特異性標記血小板，並用流式細胞儀計數。 $*P < 0.05$ 。

圖 10 為人類 *THPO* saRNA 介導的人類 *THPO* mRNA 表現改變。靶向人類 *THPO* 啟動子的候選 saRNA 以 25 nM 終濃度轉染 HepG2 細胞，轉染 72 小時後用單步驟 RT-qPCR 分析人類 *THPO* mRNA 表現。圖示為相對於對照處理 (Mock) 的 *THPO* 的 mRNA 表現改變 ($\log_2$) 從最高到最低排序。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 11 為人類 *THPO* saRNA 在人類 *THPO* 啟動子上的熱點區域。靶向人類 *THPO* 啟動子的候選 saRNA 以 25 nM 終濃度轉染 HepG2 細胞 72 小時，轉染結束後用單步驟 RT-qPCR 分析人類 *THPO* mRNA 表現。圖示為相對於對照處理 (Mock) 的 *THPO* 表現改變，按照 saRNA 在 *THPO* 啟動子上的靶點位置排序。黑色實心點表示功能性 saRNA，白色空心點表示非功能性 saRNA，虛線條框示功能性 saRNA 聚集的熱點區。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 12 為二步驟法 RT-qPCR 驗證人類 *THPO* saRNA HTS 篩選結果。用圖 12 所示 saRNA 以 25 nM 終濃度轉染 HepG2 細胞 72 小時，轉染結束後用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後用 ABI 7500 快速即時 PCR 系統進行 qPCR 擴增，同時擴增 *TBP* 和 *HPRT1* 基因作為內部參考。圖示為單個 saRNA 處理細胞後 *THPO* 相對 mRNA 的表現值。Mock、dsCon2 和 *siTHPO* (DS3A-365i) 分別為空白轉染、無關序列雙股 RNA 轉染及短小干擾 RNA 對照轉染。縱坐標值代表 2

個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

圖 13 為 ELISA 方法檢測人類 *THPO* saRNA 對人類 THPO 蛋白表現的作用。用圖 13 中所示 saRNA 以 25 nM 終濃度轉染 HepG2 細胞 72 小時，轉染結束後取培養液，離心去掉死細胞碎片取上清液用 ELISA 套組 (R&D Systems, DTP00B) 嚴格按照說明書操作檢測分泌到培養液中的 THPO 蛋白的水平。圖示為單個 saRNA 處理細胞後 THPO 蛋白的表現值。Mock、dsCon2 和 *siTHPO* (DS3A-365i) 分別為空白轉染、無關序列雙股 RNA 轉染及短小干擾 RNA 對照轉染。縱坐標值代表 2 個重複處理的平均值 $\pm$ SD。

【實施方式】

【0050】 在本發明中，相關術語採用如下定義：

【0051】 如本文所用的術語「互補」是指兩條寡核苷酸鏈彼此形成鹼基對的能力。鹼基對通常由反向平行的寡核苷酸鏈中的核苷酸之間藉由氫鍵形成。互補寡核苷酸鏈可以沃森-克里克 (Watson-Crick) 方式鹼基配對 (例如，A-T、A-U、C-G)，或以允許形成雙股體的任何其他方式 (例如 Hoogsteen 型或者反向 Hoogsteen 型鹼基配對) 進行鹼基配對。

【0052】 互補包括完全互補和不完全互補兩種情況。完全互補或 100% 互補是指雙股寡核苷酸分子的雙股區中來自第一條寡核苷酸鏈的每個核苷酸可以與第二條寡核苷酸鏈相應位置的核苷酸形成氫鍵而沒有「錯配」的情況。不完全互補是指兩條鏈的核苷酸單元不能全部互相氫鍵結合的情況。例如，對於兩條雙股區為 20 個核苷酸長度的寡核苷酸鏈，如果每條鏈上只有兩個鹼基對可以彼此氫鍵結合，則寡核苷酸鏈展現出 10% 的互補性。在同一實例中，如果每條鏈上的 18 個鹼基對可以彼此氫鍵結合，則寡核苷酸鏈展現出 90% 的互補性。實質互補是指至少約 75%、約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%、或約 100% 的互補。

【0053】 如本文所用的術語「寡核苷酸」是指核苷酸的聚合物，包

括但不限於 DNA、RNA 或 DNA/RNA 雜交體的單股或雙股分子，包括規則地和不規則地交替的脫氧核糖基部分和核糖基部分的寡核苷酸鏈，以及這些種類的寡核苷酸的修飾和以及天然存在的或非天然存在的骨架。本發明中所述的用於激活靶基因轉錄的寡核苷酸為小型活化核酸分子。

【0054】 如本文所用的術語「寡核苷酸鏈」和「寡核苷酸序列」可互換地使用，是指 35 個以下鹼基的短鏈核苷酸的總稱（包括脫氧核糖核酸 DNA 或核糖核酸 RNA 內的核苷酸）。在本發明中，寡核苷酸鏈的長度可以是 16 至 35 個核苷酸的任一長度。

【0055】 如本文所用，術語「第一核酸鏈」可以是正義股也可以是反義股，小型活化 RNA 的正義股是指小型活化 RNA 雙股體中含與靶基因的啟動子 DNA 序列的編碼股具有同一性的核酸鏈，反義股是指小型活化 RNA 雙股體中與正義股互補的核酸鏈。

【0056】 如本文所用，術語「第二核酸鏈」也可以是正義股或者反義股。當第一寡核酸鏈為正義股時，第二寡核酸鏈為反義股，當第一寡核酸鏈為反義股時，第二寡核酸鏈為正義股。

【0057】 如本文所用的術語「基因」是指編碼一條多肽鏈或轉錄一條功能 RNA 所需的全部核苷酸序列。「基因」可以是對於宿主細胞而言內源的或完全或部分重組的基因（例如，由於引入編碼啟動子的外源寡核苷酸和編碼序列或將鄰近內源編碼序列的異源啟動子導入宿主細胞）。例如，術語「基因」包括可以由外顯子和內含子組成的核酸序列。編碼蛋白質的序列是，例如，包含在起始密碼子和終止密碼子之間的開放閱讀框中的外顯子內的序列，如本文所用，「基因」可以指包括例如基因調控序列例如啟動子，增強子和本領域已知的控制另一基因的轉錄，表現或活性的所有其他序列，無論另一基因是否包含編碼序列或非編碼序列。在一種情況下，例如，「基因」可以用於描述包含調控序列例如啟動子或增強子的功能性核酸。重組基因的表現可以藉由一種或多種異源調節序列來控制。

【0058】 如本文所用的術語「靶基因」可以是天然存在於生物體中

的核酸序列、轉基因、病毒或細菌序列、染色體或染色體外和/或瞬時或穩定轉染或摻入細胞和/或其染色質。靶基因可以為蛋白質編碼基因，也可為非蛋白質編碼基因(例如微小 RNA 基因、長鏈非編碼 RNA 基因)。靶基因通常含有啟動子序列，設計與啟動子序列具有同一性(也稱同源性)的小型活化核酸分子可以實現對靶基因的正向調控，表現為靶基因表現的上調。「靶基因啟動子序列」是指靶基因的非編碼序列，在本發明中涉及「與靶基因啟動子序列互補」中靶基因啟動子序列是指該序列的編碼股，亦稱非模板股，即為與該基因編碼序列為同一序列的核酸序列。「靶點」或「靶點序列」是指靶基因啟動子序列中小型活化核酸分子的正義寡核苷酸鏈或反義寡核苷酸與之同源或互補的序列片段。

【0059】 如本文所用，術語「正義股」、「正義核酸鏈」可互換地使用，小型活化核酸分子的正義寡核苷酸鏈是指小型活化核酸分子雙股體中含與靶基因的啟動子序列的編碼股具有同一性的第一核酸鏈。

【0060】 如本文所用，術語「反義股」、「反義核酸鏈」可互換地使用，小型活化核酸分子的反義寡核苷酸鏈是指小型活化核酸分子雙股體中與正義寡核苷酸鏈互補的第二核酸鏈。

【0061】 如本文所用的術語「編碼股」是指靶基因中不能進行轉錄的那一條 DNA 鏈，該鏈的核苷酸序列與轉錄生成的 RNA 的序列一致(在 RNA 中是以 U 取代了 DNA 中的 T)。本發明中所述的靶基因啟動子雙股 DNA 序列的編碼股是指與靶基因 DNA 編碼股在同一條 DNA 鏈上的啟動子序列。

【0062】 如本文所用的術語「模板股」是指靶基因的雙股 DNA 中與編碼股互補的另一條鏈，可作為模板轉錄為 RNA 的那條鏈，該鏈與轉錄的 RNA 鹼基互補(A-U、G-C)。在轉錄過程中，RNA 聚合酶與模板股結合，並沿著模板股的 3'→5'方向移動，按照 5'→3'方向催化 RNA 的合成。本發明中所述的靶基因啟動子雙股 DNA 序列的模板股是指與靶基因 DNA 模板股在同一條 DNA 鏈上的啟動子序列。

【0063】 如本文所用的術語「啟動子」是指藉由與蛋白質編碼或 RNA 編碼核酸序列在位置上關聯而對它們的轉錄發揮調控作用的序

列。通常，真核基因啟動子包含 100~5,000 個鹼基對，儘管此長度範圍並不意味著限制本文所用的術語「啟動子」。雖然啟動子序列一般位於蛋白質編碼或者 RNA 編碼序列的 5'端，但啟動子序列也可存在於外顯子及內含子序列中。

【0064】 如本文所用的術語「轉錄起始位點」是指在基因的模板股上標誌轉錄起始的核苷酸。轉錄起始位點可出現於啟動子區的模板股上。一個基因可以有多於一個的轉錄起始位點。

【0065】 如本文所用的術語「同一性」或「同源性」是指小型活化 RNA 的其中一條寡核苷酸鏈（正義股或者反義股）與靶基因的啟動子序列的某一區域的編碼股或者模板股存在的相似性。在本文中，該「同一性」或「同源性」可以是至少約 75%、約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或約 100%。

【0066】 如本文所用的術語「突出」、「外伸」、「懸垂」可互換地使用，是指寡核苷酸鏈末端（5'或 3'）非鹼基配對核苷酸，其是由延伸超出雙股寡核苷酸內的其中一條鏈的另一條鏈產生的。延伸超出雙股體 3'和/或 5'端的單股區域被稱為突出。

【0067】 如本文所用，術語「基因激活」或「激活基因」或「基因上調」或「上調基因」可互換地使用，是指藉由測量基因轉錄水平、mRNA 水平、蛋白水平、酶活性、甲基化狀態、染色質狀態或構型、翻譯水平、或其在細胞或生物系統中的活性或狀態來測定某一核酸轉錄、翻譯或表現或活性的增加。這些活動或狀態可以直接或間接的測定。此外，「基因激活」、「激活基因」、「基因上調」、「上調基因」是指與核酸序列相關的活性增加，而不管發生這種激活的機制如何，例如其作為調節序列發揮調控作用、被轉錄成 RNA，被翻譯為蛋白質並增加蛋白質的表現。

【0068】 如本文所用，術語「小型活化 RNA」、「saRNA」、「小型活化核酸分子」可互換地使用，是指能夠促進基因表現的核酸分子，並且可以由包含與靶基因的非編碼核酸序列（例如啟動子、增強子等）具有序列同一性或同源性的核苷酸序列的第一核酸片段（反義核酸鏈，

也稱反義寡核苷酸鏈)和包含與第一核酸片段互補的核苷酸序列的第二核酸片段(正義核酸鏈,也稱有義鏈或正義寡核苷酸鏈)組成,其中該第一核酸片段和第二核酸片段形成雙股體。小型活化核酸分子也可以由合成的或者載體表現的可形成雙股區髮夾結構的單股 RNA 分子組成,其中第一區域包含與基因的啟動子靶序列具有序列同一性的核苷酸序列,第二區域包含的核苷酸序列與第一區域互補。小型活化核酸分子的雙股體區域長度通常為約 10 至約 50 個鹼基對、約 12 個至約 48 個鹼基對、約 14 個至約 46 個鹼基對、約 16 個至約 44 個鹼基對、約 18 個至約 42 個鹼基對、約 20 個至約 40 個鹼基對、約 22 個至約 38 個鹼基對、約 24 個至約 36 個鹼基對、約 26 個至約 34 個鹼基對、約 28 個至約 32 個鹼基對、通常約 10 個、約 15 個、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、約 50 個鹼基對。此外,術語「saRNA」、「小型活化 RNA」和「小型活化核酸分子」還含有除核糖核苷酸部分之外的核酸,包括但不限於修飾的核苷酸或類似物。

【0069】如本文所用,術語「熱點」是指長度至少為 30 bp 的基因啟動子區域,在這些區域,呈現出功能性小型活化核酸分子靶點的聚集,即靶向這些熱點區域的小型活化核酸分子至少 30%能夠誘導靶基因 mRNA 表現達到 1.1 倍至 2.89 倍。

【0070】如本文所用,術語「合成」是指寡核苷酸的合成方式,包括任何能夠合成 RNA 的方式,例如化學合成、體外轉錄、載體表現等。

【0071】本發明藉由 RNA 激活方式上調 *Thpo/THPO* 基因的表現,藉由增加 THPO 蛋白的表現量來治療相關疾病,尤其是血小板減少症。本發明中 *Thpo/THPO* 基因有時也稱為靶基因。

【0072】本發明提供的小型活化核酸分子的製備方法包括序列設計和序列合成。

【0073】本發明的小型活化核酸分子序列的合成可以採用化學合成的方法,或者委託專門從事核酸合成的生物技術公司合成。

【0074】一般來說,化學合成的方法包括以下四個過程:(1)寡聚核糖核苷酸的合成;(2)脫保護;(3)純化分離;(4)脫鹽及退

火。

【0075】 例如，本發明所述 saRNA 化學合成的具體步驟如下：

【0076】 (1) 寡聚核糖核苷酸的合成

【0077】 在自動 DNA/RNA 合成儀（例如，Applied Biosystems EXPEDITE8909）上設定合成 1 微莫耳的 RNA，同時設定每個循環的偶聯時間為 10-15 分鐘，起始物為固相連接的 5'-O-對二甲氧基三苯甲基-胸苷支持物，第一個循環在固相支持物上連接一個鹼基，然後在第 n 次（ $19 \geq n \geq 2$ ）循環中，在第 $n-1$ 次循環所連接的鹼基上連接一個鹼基，重複此循環直至完成全部核酸序列的合成。

【0078】 (2) 脫保護

【0079】 將連接有 saRNA 的固相支持物加入到試管中，並在此試管中加入 1 毫升的乙醇/氨水溶液（體積比為 1:3），然後密封，置於 25-70°C 溫箱中，孵育 2-30 小時，過濾含有 saRNA 的固相支持物的溶液並收集濾液，用雙蒸水淋洗固相支持物 2 次（每次 1 毫升）並收集濾液，合併收集沖提液，在真空條件下乾燥 1-12 小時。然後，加入 1 毫升四丁基氟化銨的四氫呋喃溶液（1M），室溫放置 4-12 小時，再加入 2 毫升正丁醇，高速離心收集沉澱即得到 saRNA 單股的粗產物。

【0080】 (3) 純化分離

【0081】 將得到的 saRNA 的粗產物溶解於 2 毫升濃度為 1 莫耳/升的三乙胺乙酸鹽溶液中，然後藉由高壓液相色譜反相 C18 管柱進行分離，得到純化的 saRNA 單股產物。

【0082】 (4) 脫鹽及退火

【0083】 用體積排阻凝膠過濾法去除鹽份，將正義股和反義股的寡聚核糖核酸單股按相同莫耳比混合在 1-2 毫升的緩衝液中（10 mM Tris，pH=7.5-8.0，50 mM NaCl），將此溶液加熱至 95°C，然後緩緩將此溶液冷卻至室溫，得到含有 saRNA 的溶液。

【0084】 本研究發現，將上述 saRNA 導入細胞後，能夠有效增加 *Thpo/THPO* mRNA 和 THPO 蛋白質的表現。

【0085】 下面結合具體實施例及圖式，進一步闡述本發明。應理解，

這些實施例僅用於說明本發明而不用於限制本發明的範圍。下列實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，例如 Sambrook 等人，分子選殖：實驗室手冊(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989) 中所述的條件，或按照製造廠商所建議的條件。

【0086】 實施例 1 靶向小鼠 *Thpo* 基因啟動子的 saRNA 的設計與合成

【0087】 為了篩選能夠激活 *Thpo* 基因表現的功能性 saRNA，以 *Thpo* 500 bp 的啟動子序列為模板，從 TSS 上游-500 bp 處開始選定大小為 19 bp 的靶點。然後對靶點序列進行過濾處理，保留靶點序列的標準為：1) GC 含量在 35%~65%之間；2) 不含有 5 個或者多於 5 個的連續同一核苷酸；3) 不含多於 3 個的二核苷酸重複序列；4) 不含多於 3 個的三核苷酸重複序列。過濾後，剩餘 322 個靶點序列作為候選進入篩選過程。基於這些候選序列，化學合成相應的雙股 saRNA。

【0088】 其中，該實驗中使用的 saRNA 的正義和反義股的長度均為 21 個核苷酸，該雙股 saRNA 的第一核糖核酸鏈（正義股）的 5' 區域的 19 個核苷酸與啟動子靶點序列具有 100% 的同一性，其 3' 末端含有 TT 序列；第二核糖核酸鏈的 5' 區域的 19 個核苷酸與第一核糖核酸鏈序列互補，其 3' 末端含有 TT 序列。將前述雙股 saRNA 的兩條鏈以同等量的莫耳數混合，退火後形成雙股 saRNA。

【0089】 小鼠 *Thpo* 啟動子序列如下所示，其對應於序列表中 SEQ ID No: 1 從 5' 至 3' 的位置 1 至位置 500：

-500 taatataggc aatacctact ttgccagttg gaaaggggaa atgccaggaa
-450 agacactcct ctggagcagg ggaatataga aggaaaagca agcaagccag
-400 catgctgtca gaattcagca gcaggtatac tggtcaggga aaagaaattt
-350 ggagagccag gaactgagac ttcatccatc taaaacaaga cctctctttc
-300 ccagagagaa ccgtattctg ccagatttct cctggactaa ccctcttctc
-250 tctctcactt aggtcccagg ttctcatgtc gccaggacat gagacagttc
-200 ccgctataca aattctctct agagtgtgtg tgggtggagg agctgggctc

-150 tattcatgga ccatggtcca gccatgggct ctagtcccag tagacaggaa
-100 aagaagtcgt catttccggg ggagccttca cctgggcttg gtggctctct
-50 gctctctgat tgggcggaag tggcctgggc aggcttgtga ccctactaca

【0090】 實施例 2 靶向小鼠 *Thpo* 啟動子的 saRNA 的高通量篩選

【0091】 (1) 細胞培養和轉染

【0092】 小鼠胚胎肝細胞 (BNL.CL2) (購自中國科學院上海生命科學研究院, GNM22) 培養在 DMEM 培養基 (Gibco) 中, 培養基含有 10% 小牛血清 (Sigma-Aldrich) 和 1% 青黴素/鏈黴素 (Gibco)。細胞在 5% 的 CO₂, 37°C 條件下培養。BNL.CL2 細胞以每孔 3500 鋪板到 96 孔板中, 依照製造商的說明, 使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 10 nM (除非另有說明) 濃度轉染小型活化 RNA, 轉染時間為 72 小時, 每種處理使用 2 個複孔。

【0093】 (2) 單步驟 RT-qPCR

【0094】 轉染結束後, 棄掉培養基, 每孔加入 150 µl PBS 清洗一次, 棄掉 PBS, 每孔加入 50 µl 細胞裂解液, 室溫孵育 5 分鐘。每孔取 1 µl 細胞裂解液使用單步驟 TB Green™ PrimeScrip™ RT-PCR 套組 II (Takara, RR086A)。在 ABI 7500 快速即時 (Fast Real-time) PCR 系統 (Applied Biosystems) 進行 qPCR 分析, 每個樣本重複 3 個複孔擴增, PCR 反應條件見表 1。

表1. PCR反應製備

試劑	體積
2 × 單步驟 TB Green RT-PCR 緩衝液 4	2.5 µl
PrimeScript 單步驟 酶混合物 2	0.2 µl
正向和反向引子混合物 (5 µM)	0.4 µl
無 RNase dH ₂ O	1.4 µl
粗製裂解物 (RNA)	0.5 µl
總計	5 µl

【0095】 反應條件為階段 1 反轉錄反應：42℃，5 分鐘；95℃ 10 秒；階段 2 PCR 反應：95℃ 5 秒，60℃ 20 秒，擴增 45 個循環。以 *Sdha* 及 *Tbp* 為內部參考基因。*Thpo*、*Sdha* 及 *Tbp* 所用 PCR 引子見表 2，其中 *Thpo* 用 *Thpo* F1/R1 引子對擴增。

表 2. RT-qPCR 分析的引子序列

引子名稱	序列號	序列 (5'-3')
<i>Thpo</i> F1	SEQ ID NO：297	TGGAGCTGACTGATTTGCTCCTG
<i>Thpo</i> R1	SEQ ID NO：298	AACAGGGATAGACAAAGGGTCG
<i>Sdha</i> F	SEQ ID NO：299	ATGGTCACTAGGGCTGGTTTG
<i>Sdha</i> R	SEQ ID NO：300	ACGACACCCTTCTGTGATGAG
<i>Tbp</i> F	SEQ ID NO：301	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACT
<i>Tbp</i> R	SEQ ID NO：302	TGTCCGTGGCTCTCTTATTC

【0096】 為了計算某個 saRNA 轉染樣本的 *Thpo* (目的基因) 的相對於對照處理 (Mock) 的表現值 (*E_{rel}*)，用公式 1 代入目的基因及 2 個內部參考基因的 Ct 值計算：

$$E_{rel} = 2^{(CtTm - CtTs)} / ((2^{(CtR1m - CtR1s)} * 2^{(CtR2m - CtR2s)})^{(1/2)}) \quad \text{(公式 1)}$$

其中，CtTm 為來自對照處理 (Mock) 樣本的目的基因的 Ct 值，CtTs 為來自 saRNA 處理樣本的目的基因的 Ct 值，CtR1m 為來自 Mock 處理樣本的內部參考基因 1 的 Ct 值，CtR1s 為來自 saRNA 處理樣本的內部參考基因 1 的 Ct 值，CtR2m 為來自對照處理樣本的內部參考基因 2 的 Ct 值，CtR2s 為來自 saRNA 處理樣本的內部參考基因 2 的 Ct 值。

【0097】 (3) 小鼠功能性 saRNA 篩選

【0098】 為了獲得能夠激活 *Thpo* 轉錄的 saRNA，用上述 322 個 saRNA 分別轉染 BNL.CL2 細胞，轉染濃度為 10 nM，轉染 72 小時後以如上所述相同的方法，裂解細胞並進行單步驟 RT-qPCR 分析得到每個 saRNA 處理樣本的 *Thpo* 基因的相對 (與對照處理組比較) 表現值。

如表 3 所示，有 18(5.6%)個 saRNA 顯示出高度激活作用，79(24.5%)個 saRNA 顯示出輕度激活作用，有 142 (69.9%) 個 saRNA 對 *Thpo* 的表現不產生影響。激活的最大幅度為 2.89 倍，最大抑制幅度為 0.26 倍，這些具有激活活性的 saRNA 被稱為激活性 saRNA 。

表 3. 小鼠 *Thpo* saRNA 高通量篩選結果統計

saRNA 活性分類	<i>Thpo</i> mRNA 改變幅度的 log ₂ 值 (倍數)	saRNA 數量	百分比
高度激活	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤1.53 (2.89)	18	5.6%
輕度激活	≥ 0.13 (1.10) ~ < 0.58 (1.50)	79	24.5%
無激活作用	< 0.13 (1.10)	225	69.9%
總計		322	100%

【0099】 如圖 1 所示，進一步顯示了小鼠 *Thpo* saRNA 的 *Thpo* 表現改變從最高到最低排序。其中 *Thpo* 活性 saRNA 序列、活性靶點序列以及 *Thpo* mRNA 表現改變，如表 4 所示。

表 4. 小鼠活性 saRNA 序列、其靶點序列以及其導致的小鼠 *Thpo* mRNA 表現改變

saRNA	靶點序列 (5'-3')	saRNA 正義序列 (5'-3')	saRNA 反義序列 (5'-3')	<i>Thpo</i> mRNA 相對表現改變倍數
RAG3-493	GGCAATACCTACTTTGCCA (SEQ ID NO:200)	GGCAUACCUACUUUGCCATT (SEQ ID NO:6)	UGGCAAAGUAGGUUUGCCTT (SEQ ID NO:103)	1.17
RAG3-490	AATACCTACTTTGCCAGTT (SEQ ID NO:201)	AAUACCUACUUUGCCAGUUTT (SEQ ID NO:7)	AACUGGCAAAGUAGGUUUTT (SEQ ID NO:104)	1.21
RAG3-486	CCTACTTTGCCAGTTGGAA (SEQ ID NO:202)	CCUACUUUGCCAGUUGGAATT (SEQ ID NO:8)	UUCCAACUGGCAAAGUAGGTT (SEQ ID NO:105)	1.76
RAG3-484	TACTTTGCCAGTTGGAAAG (SEQ ID NO:203)	UACUUUGCCAGUUGGAAAGTT (SEQ ID NO:9)	CUUCCAACUGGCAAAGUATT (SEQ ID NO:106)	1.13
RAG3-483	ACTTTGCCAGTTGGAAAGG (SEQ ID NO:204)	ACUUUGCCAGUUGGAAAGGTT (SEQ ID NO:10)	CCUUUCCAACUGGCAAAGUTT (SEQ ID NO:107)	1.24
RAG3-479	TGCCAGTTGGAAAGGGGAA (SEQ ID NO:205)	UGCCAGUUGGAAAGGGGAATT (SEQ ID NO:11)	UUCCCCUUUCCAACUGGCATT (SEQ ID NO:108)	1.25
RAG3-474	GTGGAAAGGGGAAATGCC (SEQ ID NO:206)	GUUGGAAAGGGGAAAUGCCCTT (SEQ ID NO:12)	GGCAUUUCCCCCUUCCAACCTT (SEQ ID NO:109)	1.22
RAG3-472	TGGAAAGGGGAAATGCCAG (SEQ ID NO:207)	UGGAAAGGGGAAAUGCCAGTT (SEQ ID NO:13)	CUGGCAUUUCCCCCUUCCATT (SEQ ID NO:110)	1.41
RAG3-471	GGAAAGGGGAAATGCCAGG (SEQ ID NO:208)	GGAAAGGGGAAAUGCCAGGTT (SEQ ID NO:14)	CCUGGCAUUUCCCCCUUCCCTT (SEQ ID NO:111)	1.81
RAG3-466	GGGGAATGCCAGGAAAGA (SEQ ID NO:209)	GGGGAUAUGCCAGGAAAGATT (SEQ ID NO:15)	UCUUUCCUGGCAUUUCCCCCTT (SEQ ID NO:112)	1.64
RAG3-465	GGGAAATGCCAGGAAAGAC (SEQ ID NO:210)	GGGAAUUGCCAGGAAAGACTT (SEQ ID NO:16)	GUCUUUCCUGGCAUUUCCCTT (SEQ ID NO:113)	1.29
RAG3-461	AATGCCAGGAAAGACACTC (SEQ ID NO:211)	AAUGCCAGGAAAGACACUCTT (SEQ ID NO:17)	GAGUGUCUUUCCUGGCAUUTT (SEQ ID NO:114)	1.48
RAG3-460	ATGCCAGGAAAGACACTCC (SEQ ID NO:212)	AUGCCAGGAAAGACACUCCTT (SEQ ID NO:18)	GGAGUGUCUUUCCUGGCAUTT (SEQ ID NO:115)	1.14

RAG3-459	TGCCAGGAAAGACACTCCT (SEQ ID NO:213)	UGCCAGGAAAGACACUCCUTT (SEQ ID NO:19)	AGGAGUGUCUUCCUGGCATT (SEQ ID NO:116)	1.10
RAG3-454	GGAAAGACACTCCTCTGGA (SEQ ID NO:214)	GGAAGACACUCCUCUGGATT (SEQ ID NO:20)	UCCAGAGAGUGUCUUUCCTT (SEQ ID NO:117)	1.24
RAG3-453	GAAAGACACTCCTCTGGAG (SEQ ID NO:215)	GAAAGACACUCCUCUGGAGTT (SEQ ID NO:21)	CUCCAGAGAGUGUCUUUCTT (SEQ ID NO:118)	1.49
RAG3-450	AGACACTCCTCTGGAGCAG (SEQ ID NO:216)	AGACACUCCUCUGGAGCAGTT (SEQ ID NO:22)	CUGCUCCAGAGAGUGUCUTT (SEQ ID NO:119)	1.24
RAG3-449	GACACTCCTCTGGAGCAGG (SEQ ID NO:217)	GACACUCCUCUGGAGCAGGTT (SEQ ID NO:23)	CCUGCUCCAGAGAGUGUCTT (SEQ ID NO:120)	1.14
RAG3-448	ACACTCCTCTGGAGCAGGG (SEQ ID NO:218)	ACACUCCUCUGGAGCAGGTT (SEQ ID NO:24)	CCCUGCUCCAGAGAGUGUTT (SEQ ID NO:121)	1.54
RAG3-446	ACTCCTCTGGAGCAGGGGA (SEQ ID NO:219)	ACUCCUCUGGAGCAGGGGATT (SEQ ID NO:25)	UCCCCUGCUCCAGAGAGUTT (SEQ ID NO:122)	1.36
RAG3-441	TCTGGAGCAGGGGAATATA (SEQ ID NO:220)	UCUGGAGCAGGGGAUAUATT (SEQ ID NO:26)	UAUAUCCCCUGCUCCAGATT (SEQ ID NO:123)	1.15
RAG3-440	CTGGAGCAGGGGAATATAG (SEQ ID NO:221)	CUGGAGCAGGGGAUAUAGTT (SEQ ID NO:27)	CUAUAUCCCCUGCUCCAGTT (SEQ ID NO:124)	1.14
RAG3-439	TGGAGCAGGGGAATATAGA (SEQ ID NO:222)	UGGAGCAGGGGAUAUAGATT (SEQ ID NO:28)	UCUAUAUCCCCUGCUCCATT (SEQ ID NO:125)	1.10
RAG3-437	GAGCAGGGGAATATAGAAG (SEQ ID NO:223)	GAGCAGGGGAUAUAGAAGTT (SEQ ID NO:29)	CUUCUAUAUCCCCUGCUCTT (SEQ ID NO:126)	1.12
RAG3-436	AGCAGGGGAATATAGAAGG (SEQ ID NO:224)	AGCAGGGGAUAUAGAAGTT (SEQ ID NO:30)	CCUUCUAUAUCCCCUGCUTT (SEQ ID NO:127)	1.99
RAG3-435	GCAGGGGAATATAGAAGGA (SEQ ID NO:225)	GCAGGGGAUAUAGAAGGATT (SEQ ID NO:31)	UCCUUCUAUAUCCCCUGCTT (SEQ ID NO:128)	1.83
RAG3-434	CAGGGGAATATAGAAGGAA (SEQ ID NO:226)	CAGGGGAUAUAGAAGGAATT (SEQ ID NO:32)	UUCCUUCUAUAUCCCCUGTT (SEQ ID NO:129)	1.47
RAG3-433	AGGGGAATATAGAAGGAAA (SEQ ID NO:227)	AGGGGAUAUAGAAGGAAATT (SEQ ID NO:33)	UUUCCUUCUAUAUCCCCUTT (SEQ ID NO:130)	1.13
RAG3-432	GGGGAATATAGAAGGAAAA (SEQ ID NO:228)	GGGGAAUAUAGAAGGAAAATT (SEQ ID NO:34)	UUUCCUUCUAUAUCCCCCTT (SEQ ID NO:131)	1.10
RAG3-430	GGAATATAGAAGGAAAAGC (SEQ ID NO:229)	GGAAUAUAGAAGGAAAAGCTT (SEQ ID NO:35)	GCUUUUCCUUCUAUAUUCCTT (SEQ ID NO:132)	1.20

RAG3-426	TATAGAGGAAAAGCAAGC (SEQ ID NO:230)	UAUAGAGGAAAAGCAAGCTT (SEQ ID NO:36)	GCUUGCUUUCCUUCUAUATT (SEQ ID NO:133)	1.18
RAG3-425	ATAGAGGAAAAGCAAGCA (SEQ ID NO:231)	AUAGAGGAAAAGCAAGCATT (SEQ ID NO:37)	UGCUUGCUUUUCCUUCUAUTT (SEQ ID NO:134)	1.57
RAG3-424	TAGAGGAAAAGCAAGCAA (SEQ ID NO:232)	UAGAGGAAAAGCAAGCAATT (SEQ ID NO:38)	UUGCUUGCUUUUCCUUCUATT (SEQ ID NO:135)	1.79
RAG3-421	AAGGAAAAGCAAGCAAGCC (SEQ ID NO:233)	AAGGAAAAGCAAGCAAGCCTT (SEQ ID NO:39)	GGCUUGCUUGCUUUUCCUUTT (SEQ ID NO:136)	1.11
RAG3-420	AGGAAAAGCAAGCAAGCCA (SEQ ID NO:234)	AGGAAAAGCAAGCAAGCCATT (SEQ ID NO:40)	UGGCUUGCUUGCUUUUCCUTT (SEQ ID NO:137)	1.25
RAG3-419	GGAAAAGCAAGCAAGCCAG (SEQ ID NO:235)	GGAAAAGCAAGCAAGCCAGTT (SEQ ID NO:41)	CUGGCUUGCUUGCUUUUCCTT (SEQ ID NO:138)	1.51
RAG3-418	GAAAAGCAAGCAAGCCAGC (SEQ ID NO:236)	GAAAAGCAAGCAAGCCAGCTT (SEQ ID NO:42)	GCUGGCUUGCUUGCUUUUUCTT (SEQ ID NO:139)	1.12
RAG3-417	AAAAGCAAGCAAGCCAGCA (SEQ ID NO:237)	AAAAGCAAGCAAGCCAGCATT (SEQ ID NO:43)	UGCUGGCUUGCUUGCUUUUUTT (SEQ ID NO:140)	1.19
RAG3-414	AGCAAGCAAGCCAGCATGC (SEQ ID NO:238)	AGCAAGCAAGCCAGCAUGCTT (SEQ ID NO:44)	GCAUGCUGGCUUGCUUGCUTT (SEQ ID NO:141)	1.27
RAG3-410	AGCAAGCCAGCATGCTGTC (SEQ ID NO:239)	AGCAAGCCAGCAUGCUGUCTT (SEQ ID NO:45)	GACAGCAUGCUGGCUUGCUTT (SEQ ID NO:142)	1.39
RAG3-409	GCAAGCCAGCATGCTGTCA (SEQ ID NO:240)	GCAAGCCAGCAUGCUGUCATT (SEQ ID NO:46)	UGACAGCAUGCUGGCUUGCTT (SEQ ID NO:143)	1.38
RAG3-408	CAAGCCAGCATGCTGTGTCAG (SEQ ID NO:241)	CAAGCCAGCAUGCUGUCAGTT (SEQ ID NO:47)	CUGACAGCAUGCUGGCUUGTT (SEQ ID NO:144)	2.09
RAG3-405	GCCAGCATGCTGTCAGAAAT (SEQ ID NO:242)	GCCAGCAUGCUGUCAGAAUTT (SEQ ID NO:48)	AUUCUGACAGCAUGCUGGCTT (SEQ ID NO:145)	1.53
RAG3-404	CCAGCATGCTGTCAGAAAT (SEQ ID NO:243)	CCAGCAUGCUGUCAGAAUUTT (SEQ ID NO:49)	AAUUCUGACAGCAUGCUGGTT (SEQ ID NO:146)	1.18
RAG3-397	GCTGTCAGAAATTCAGCAGC (SEQ ID NO:244)	GCUGUCAGAAUUCAGCAGCTT (SEQ ID NO:50)	GCUGCUGAAUUCUGACAGCTT (SEQ ID NO:147)	1.34
RAG3-396	CTGTCAGAAATTCAGCAGCA (SEQ ID NO:245)	CUGUCAGAAUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO:51)	UGCUGCUGAAUUCUGACAGTT (SEQ ID NO:148)	1.17
RAG3-378	AGGTATACTGTTTCAGGGAA (SEQ ID NO:246)	AGGUAAUCUGUUCAGGGAAAT (SEQ ID NO:52)	UUCCCUGAACAGUAUACCTT (SEQ ID NO:149)	1.36

RAG3-377	GGTATACTGTTCAGGGAAA (SEQ ID NO:247)	GGUAUCUGUUCAGGGAATT (SEQ ID NO:53)	UUUCCUGAACAGUAUACCTT (SEQ ID NO:150)	1.32
RAG3-376	GTATACTGTTCAGGGAAA (SEQ ID NO:248)	GUAUACUGUUCAGGAAAATT (SEQ ID NO:54)	UUUCCUGAACAGUAUACTT (SEQ ID NO:151)	1.67
RAG3-375	TATACTGTTCAGGGAAAAG (SEQ ID NO:249)	UAUACUGUUCAGGAAAAGTT (SEQ ID NO:55)	CUUUCCUGAACAGUAUATT (SEQ ID NO:152)	1.11
RAG3-360	AAAGAAATTGGAGAGCCA (SEQ ID NO:250)	AAAGAAUUUGGAGAGCCATT (SEQ ID NO:56)	UGGCUCUCCAAAUUUCUUUTT (SEQ ID NO:153)	1.12
RAG3-337	CTGAGACTTCATCCATCTA (SEQ ID NO:251)	CUGAGACUUCAUCCAUCUATT (SEQ ID NO:57)	UAGAUGGAUGAAGUCUCAGTT (SEQ ID NO:154)	1.15
RAG3-290	CCGTATTCTGCCAGATTTC (SEQ ID NO:252)	CCGUUUUCUGCCAGAUUUUCTT (SEQ ID NO:58)	GAAAUUCUGGCAGAUACGGTT (SEQ ID NO:155)	1.14
RAG3-273	TCTCCTGGACTAACCCCTCT (SEQ ID NO:253)	UCUCCUGGACUAACCCUCUCTT (SEQ ID NO:59)	AGAGGGUUAGUCCAGGAGATT (SEQ ID NO:156)	2.89
RAG3-272	CTCCTGGACTAACCCCTCTT (SEQ ID NO:254)	CUCCUGGACUAACCCUCUUCTT (SEQ ID NO:60)	AAGAGGGUUAGUCCAGGAGTT (SEQ ID NO:157)	1.89
RAG3-271	TCCTGGACTAACCCCTCTC (SEQ ID NO:255)	UCCUGGACUAACCCUCUUCTT (SEQ ID NO:61)	GAAGAGGGUUAGUCCAGGATT (SEQ ID NO:158)	1.17
RAG3-244	ACTTAGGTCCCAGGTTCTC (SEQ ID NO:256)	ACUUAGGUCCCAGGUUCUCTT (SEQ ID NO:62)	GAGAACCUGGGACCUAAGUTT (SEQ ID NO:159)	1.17
RAG3-243	CTTAGGTCCCAGGTTCTCA (SEQ ID NO:257)	CUUAGGUCCCAGGUUCUCATT (SEQ ID NO:63)	UGAGAACCUGGGACCUAAGTT (SEQ ID NO:160)	1.45
RAG3-242	TTAGGTCCCAGGTTCTCAT (SEQ ID NO:258)	UUAGGUCCCAGGUUCUCAUTT (SEQ ID NO:64)	AUGAGAACCUGGGACCUAATT (SEQ ID NO:161)	1.27
RAG3-239	GGTCCCAGGTTCTCATGTC (SEQ ID NO:259)	GGUCCCAGGUUCUCAUGUCTT (SEQ ID NO:65)	GACAUGAGAACCUGGGACCCTT (SEQ ID NO:162)	1.10
RAG3-229	TCTCATGTCCGCCAGGACAT (SEQ ID NO:260)	UCUCAUGUCGCCAGGACAUTT (SEQ ID NO:66)	AUGUCCUGGCACAUAGAGATT (SEQ ID NO:163)	1.12
RAG3-227	TCATGTCCGCCAGGACATGA (SEQ ID NO:261)	UCAUGUCGCCAGGACAUGATT (SEQ ID NO:67)	UCAUGUCCUGGCACAUAGATT (SEQ ID NO:164)	1.39
RAG3-226	CATGTCCGCCAGGACATGAG (SEQ ID NO:262)	CAUGUCGCCAGGACAUGAGTT (SEQ ID NO:68)	CUCAUGUCCUGGCACAUAGTT (SEQ ID NO:165)	1.30
RAG3-219	CCAGGACATGAGACAGTTC (SEQ ID NO:263)	CCAGGACAUGAGACAGUUCTT (SEQ ID NO:69)	GAACUGUCUCAUGUCCUGGTT (SEQ ID NO:166)	1.24

RAG3-215	GACATGAGACAGTTCCCGC (SEQ ID NO:264)	GACAUGAGACAGUCCCCGCTT (SEQ ID NO:70)	GCGGGAACUGUCUAUGUCTT (SEQ ID NO:167)	1.32
RAG3-214	ACATGAGACAGTTCCCGCT (SEQ ID NO:265)	ACAUGAGACAGUCCCCGCTT (SEQ ID NO:71)	AGCGGGAACUGUCUAUGUCTT (SEQ ID NO:168)	1.28
RAG3-206	CAGTTCCCGCTATACAAAT (SEQ ID NO:266)	CAGUCCCCGCUAUACAAAUUTT (SEQ ID NO:72)	AUUUGUAUAGCGGGAACUGTT (SEQ ID NO:169)	1.31
RAG3-205	AGTICCCGCTATACAAATT (SEQ ID NO:267)	AGUCCCCGCUAUACAAAUUTT (SEQ ID NO:73)	AAUUUGUAUAGCGGGAACUTT (SEQ ID NO:170)	1.14
RAG3-204	GTTCCCGCTATACAAATTC (SEQ ID NO:268)	GUUCCCCGCUAUACAAAUUCTT (SEQ ID NO:74)	GAAUUUGUAUAGCGGGAAC TT (SEQ ID NO:171)	1.65
RAG3-203	TTCCCGCTATACAAATTCT (SEQ ID NO:269)	UUCCCCGCUAUACAAAUUCUTT (SEQ ID NO:75)	AGAAUUUGUAUAGCGGGAATT (SEQ ID NO:172)	1.42
RAG3-202	TCCCGCTATACAAATTCTC (SEQ ID NO:270)	UCCCCGCUAUACAAAUUCUCTT (SEQ ID NO:76)	GAGAAUUUGUAUAGCGGGGATT (SEQ ID NO:173)	1.31
RAG3-164	GAGGAGCTGGGCTCTATTCT (SEQ ID NO:271)	GAGGAGCUGGGCUCUAUUCTT (SEQ ID NO:77)	GAAUAGAGCCCCAGCUCUCTT (SEQ ID NO:174)	1.13
RAG3-158	CTGGGCTCTATTTCATGGAC (SEQ ID NO:272)	CUGGGCUCUAUUCAUGGACTT (SEQ ID NO:78)	GUCCAUGAAUAGAGCCCCAGTT (SEQ ID NO:175)	1.17
RAG3-153	CTCTATTTCATGGACCATGG (SEQ ID NO:273)	CUCUAUUCAUGGACCAUGGTT (SEQ ID NO:79)	CCAUGGUCCAUGAAUAGAGTT (SEQ ID NO:176)	1.17
RAG3-152	TCTATTTCATGGACCATGGT (SEQ ID NO:274)	UCUAUUCAUGGACCAUGGUTT (SEQ ID NO:80)	ACCAUGGUCCAUGAAUAGATT (SEQ ID NO:177)	1.10
RAG3-151	CTATTTCATGGACCATGGTC (SEQ ID NO:275)	CUAUUCAUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:81)	GACCAUGGUCCAUGAAUAGTT (SEQ ID NO:178)	1.44
RAG3-150	TATTTCATGGACCATGGTCC (SEQ ID NO:276)	UAUUCAUGGACCAUGGUCCTT (SEQ ID NO:82)	GGACCAUGGUCCAUGAAUATT (SEQ ID NO:179)	1.24
RAG3-147	TCATGGACCATGGTCCAGC (SEQ ID NO:277)	UCAUGGACCAUGGUCCAGCTT (SEQ ID NO:83)	GCUGGACCAUGGUCCAUGATT (SEQ ID NO:180)	1.31
RAG3-146	CATGGACCATGGTCCAGCC (SEQ ID NO:278)	CAUGGACCAUGGUCCAGCCTT (SEQ ID NO:84)	GGCUGGACCAUGGUCCAUGTT (SEQ ID NO:181)	1.44
RAG3-142	GACCATGGTCCAGCCATGG (SEQ ID NO:279)	GACCAUGGUCCAGCCAUGGTT (SEQ ID NO:85)	CCAUGGCUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:182)	1.26
RAG3-134	TCCAGCCATGGGCTCTAGT (SEQ ID NO:280)	UCCAGCCAUGGGCUUAUGUTT (SEQ ID NO:86)	ACUAGAGCCCCAUGGCUGGATT (SEQ ID NO:183)	1.41

RAG3-133	CCAGCCATGGGCTCTAGTC (SEQ ID NO:281)	CCAGCCAUGGGCUCUAGUCTT (SEQ ID NO:87)	GACUAGAGCCCAUGGCUGGTT (SEQ ID NO:184)	1.11
RAG3-129	CCATGGGCTCTAGTCCCGAG (SEQ ID NO:282)	CCAUGGGCUCUAGUCCCAGTT (SEQ ID NO:88)	CUGGACUAGAGCCCAUGGTT (SEQ ID NO:185)	1.30
RAG3-122	CTCTAGTCCCAGTAGACAG (SEQ ID NO:283)	CUCUAGUCCCAGUAGACAGTT (SEQ ID NO:89)	CUGUCUACUGGGACUAGAGTT (SEQ ID NO:186)	1.51
RAG3-121	TCTAGTCCCAGTAGACAGG (SEQ ID NO:284)	UCUAGUCCCAGUAGACAGTT (SEQ ID NO:90)	CCUGUCUACUGGGACUAGATT (SEQ ID NO:187)	1.72
RAG3-111	GTAGACAGGAAAGAGTC (SEQ ID NO:285)	GUAGACAGGAAAGAGUCTT (SEQ ID NO:91)	GACUUCUUUCCUGUCUACTT (SEQ ID NO:188)	1.26
RAG3-110	TAGACAGGAAAGAGTCG (SEQ ID NO:286)	UAGACAGGAAAGAGUCGTT (SEQ ID NO:92)	CGACUUCUUUCCUGUCUATT (SEQ ID NO:189)	1.25
RAG3-101	AAGAAGTCGTCATTTCGG (SEQ ID NO:287)	AAAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (SEQ ID NO:93)	CGGAAAUGACGACUUCUUUTT (SEQ ID NO:190)	1.14
RAG3-100	AAGAAGTCGTCATTTCGG (SEQ ID NO:288)	AAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (SEQ ID NO:94)	CCGAAAUGACGACUUCUUTT (SEQ ID NO:191)	1.15
RAG3-099	AGAAGTCGTCATTTCGGG (SEQ ID NO:289)	AGAAGUCGUCAUUUCCGGGTT (SEQ ID NO:95)	CCCGGAAAUGACGACUUCUTT (SEQ ID NO:192)	1.12
RAG3-078	AGCCTTCACCTGGGCTTGG (SEQ ID NO:290)	AGCCUUCACCCUGGGCUUGGTT (SEQ ID NO:96)	CCAAGCCCAGGUGAAGGCUTT (SEQ ID NO:193)	1.10
RAG3-071	ACCTGGGCTTGGTGGCTCT (SEQ ID NO:291)	ACCUGGCUUUGGUGGCUCUTT (SEQ ID NO:97)	AGAGCCACCAAGCCCAGGUTT (SEQ ID NO:194)	1.10
RAG3-047	CTCTGATTGGGCGGAAGTG (SEQ ID NO:292)	CUCUGAUUGGGCGGAAGUGTT (SEQ ID NO:98)	CACUUCGCCCCAAUCAGAGTT (SEQ ID NO:195)	1.66
RAG3-046	TCTGATTGGGCGGAAGTGG (SEQ ID NO:293)	UCUGAUUGGGCGGAAGUGGTT (SEQ ID NO:99)	CCACUUCGCCCCAAUCAGATT (SEQ ID NO:196)	1.15
RAG3-044	TGATTGGGCGGAAGTGGCC (SEQ ID NO:294)	UGAUUGGGCGGAAGUGGCCTT (SEQ ID NO:100)	GGCCACUUCGCCCCAAUCATT (SEQ ID NO:197)	1.20
RAG3-023	GGCAGGCTTGTGACCCCTAC (SEQ ID NO:295)	GGCAGGCUUGUGACCCUACTT (SEQ ID NO:101)	GUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (SEQ ID NO:198)	1.27
RAG3-022	GCAGGCTTGTGACCCCTACT (SEQ ID NO:296)	GCAGGCUUGUGACCCUACUTT (SEQ ID NO:102)	AGUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (SEQ ID NO:199)	1.11

【0100】 對 322 個 saRNA 的活性按照其在 *Thpo* 啟動子上的位置排列，很明顯地看到功能性 saRNA 的分佈呈現聚集現象，即在某些啟動子區域，激活性 saRNA 聚集在特定的「熱點（hot spot）」區域（圖 2）。如圖 2 所示，在啟動子的-493/-356 區域（H1）、-273/-183 區域（H2）和-164/-80（H3）分別出現 3 個熱點區域，表現為激活性 saRNA 的高度聚集。該分析結果表明，激活性 saRNA 在啟動子上並非隨機分佈，而是存在特定的熱點區域。

【0101】 熱點 H1（5'至 3'：-493 至-356）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:2 從 5'至 3'的位置 1 至位置 138：

```
1 ggcaatacct actttgccag ttggaaaggg gaaatgccag gaaagacact
51 cctctggagc aggggaatat agaaggaaaa gcaagcaagc cagcatgctg
101 tcagaattca gcagcaggta tactgttcag ggaaaaga
```

【0102】 熱點 H2（5'至 3'：-273 至-183）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:3 從 5'至 3'的位置 1 至位置 91：

```
1 tctcctggac taacctctt ctctctctca cttaggtccc aggttctcat
51 gtcgccagga catgagacag ttcccgtat acaaattctc t
```

【0103】 熱點 H3（5'至 3'：-164 至-80）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:4 從 5'至 3'的位置 1 至位置 85：

```
1 gaggagctgg gctctattca tggacatgg tccagccatg ggctctagtc
51 ccagtagaca ggaaaagaag tcgtcatttc cgggg
```

【0104】 實施例 3 saRNA 促進小鼠肝細胞中 *Thpo* mRNA 的表現

【0105】 （1）細胞培養和轉染

【0106】 細胞培養如實施例 2 所述，小鼠胚胎肝細胞（BNL.CL2）以每孔 1×10^5 個細胞鋪板到六孔板中，依照製造商的說明，使用 RNAiMax（Invitrogen，Carlsbad，CA）以 10 nM 濃度轉染小鼠 *Thpo*

saRNA，轉染時間為 72 小時，每種處理使用 2 個複孔。

【0107】 （2）二步驟法 RT-qPCR

【0108】 轉染結束後，棄掉培養基，每孔加入 500 μl 細胞裂解液，室溫孵育 5 分鐘。用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後在 ABI 7500 快速即時（Fast Real-time）PCR 系統（Applied Biosystems）進行 qPCR 分析，每個樣本重複 3 個複孔擴增，PCR 反應條件見表 5 和表 6。

表 5. RT 反應製備

試劑（RT反應1）	體積	試劑（RT反應2）	體積
5 × gDNA Eraser緩衝液	2 μl	5 × PrimeScript 緩衝液2	4 μl
gDNA Eraser	1 μl	PrimeScript RT酶混合物1	1 μl
總量RNA(1 μg)+ D.W	7 μl	RT 引子混合物	1 μl
終體積	10 μl	無RNase dH ₂ O	4 μl
42℃ 2分鐘，儲存於4℃		RT反應1	10 μl
		終體積	20 μl
		37℃ 15分鐘，85℃ 5秒，儲存於 4℃	

表 6. RT-qPCR 反應製備

試劑	體積
SYBR Premix Ex Taq II（2 ×）	5 μl
ROX 參考染料 II（50 ×）	0.2 μl
正向和反向引子混合物（5 μM）	0.8 μl
cDNA（RT 產物）	4 μl
總計	10 μl

【0109】 反應條件為：95℃ 30 秒，95℃ 5 秒，60℃ 30 秒，擴增 40 個循環。同時擴增 *Tbp* 基因作為內部參考，其中 *Thpo* 用 *Thpo* F1/R1 引子對擴增，擴增引子見表 2。

【0110】 為了計算某個 saRNA 轉染樣本的 *Thpo*（目的基因）的相

對於對照處理（Mock）的表現值（ E_{rel} ），用公式 2 代入目的基因及 1 個內部參考基因的 Ct 值計算。

$$E_{rel} = 2^{(Ct_{Tm}-Ct_{Ts})} / 2^{(Ct_{Rm}-Ct_{Rs})} \quad (\text{公式 2})$$

【0111】圖 3 所示為不同小鼠 saRNA 處理後細胞中 *Thpo* 相對 mRNA 的表現值。以對照組（Mock）作為空白轉染對照，與對照組相比，小鼠 *Thpo* 短小干擾 RNA（siRNA）DS03-432i 組的 mRNA 相對表現值下降了 53.5%，這說明 siRNA 作為短小干擾 RNA 對照轉染是成功的。不同 saRNA，包括 DS03-0007（RAG3-424），DS03-0014（RAG3-425），DS03-0022（RAG3-243）和 DS03-0024（RAG3-151），組的 mRNA 相對表現值均高於對照組，分別上升了 25.5%、16.5%、16% 和 41%。這說明隨機選擇的激活性 saRNA 在 BNL.CL2 細胞中能夠促進 *Thpo* mRNA 的表現。

【0112】實施例 4 小鼠 *Thpo* saRNA 促進 LPC-H12 細胞中 *Thpo* mRNA 的表現

【0113】細胞培養如實施例 2 所述，小鼠肝癌細胞（LPC-H12）（購自北京北納創聯生物科技有限公司，BNCC101945）以每孔 2×10^5 個細胞鋪板到六孔板中，依照製造商的說明，使用 RNAiMax（Invitrogen，Carlsbad，CA）以 10 nM 濃度轉染小鼠 *Thpo* saRNA，轉染時間為 72 小時，每種處理使用 2 個複孔。二步驟法 RT-qPCR 如實施例 3 所述。

【0114】如圖 4 所示為不同 saRNA 處理後細胞中 *Thpo* 相對 mRNA 的表現值。以對照處理作為空白轉染對照，與對照組相比，小鼠 siRNA（DS03-432i）組的 mRNA 相對表現值下降了 47%，這說明 siRNA 作為短小干擾 RNA 對照轉染是成功的。DS03-0007（RAG3-424），DS03-0019（RAG3-453），DS03-0022（RAG3-243），DS03-0024（RAG3-151），DS03-0027（RAG3-134）組的 mRNA 相對表現值均高於對照組，其 mRNA 相對表現值分別上升了 52%，90%，30.5%，

11.5%和 34%，以 DS03-0019 的激活效果（90%）尤為明顯。這說明隨機選擇的激活性 saRNA 在 LPC-H12 細胞中能夠不同程度地促進 *Thpo* mRNA 的表現。

【0115】 實施例 5 小鼠 *Thpo* saRNA 促進原代小鼠肝細胞中 *Thpo* mRNA 的表現

【0116】 （1）原代小鼠肝細胞的培養和轉染

【0117】 C57 雌性小鼠（6-8 週齡，體重約 25 g，購自揚州大學比較醫學中心）在小鼠動物房適應 3 天後，採用兩步灌注法分離原代小鼠肝細胞（Primary mouse liver cells）。兩步灌注法的具體操作簡述如下：使用異氟烷維持麻醉小鼠，酒精消毒並用剪刀打開小鼠腹腔，暴露肝門靜脈及下腔靜脈；將針頭插入肝門靜脈，用蠕動泵將 37℃ 預熱的前灌液（HBSS+HEPES+EGTA）以 1~2 ml/min 的速度灌注，小鼠肝臟膨脹發白說明插管成功；剪開下腔靜脈，逐漸增加灌流速度至 7~9 ml/min，灌注 10~15 分鐘；加入膠原酶溶液消化約 15 分鐘，灌流速度 5~8 ml/min。消化完成後將肝轉移至培養皿並收集肝細胞，經 200 目過濾器後，用 DMEM 培養基洗 3 次，4℃ 離心（100 g）5 分鐘。將細胞以 2×10^5 個/每孔（膠原包被過的孔板）培養在含 10% 血清的 DMEM-L 培養基中，培養 4~6 小時後更換不含血清的 DMEM-L 培養基，在 5% CO₂，37℃ 條件下培養過夜。次日，依照製造商的說明，使用 RNAiMax（Invitrogen，Carlsbad，CA）以 10 nM 濃度轉染小鼠 *Thpo* saRNA，轉染時間為 72 小時，每種處理使用 2 個複孔。二步驟法 RT-qPCR 如實施例 3 所述。

【0118】 圖 5 所示為不同小鼠 saRNA 處理後細胞中 *Thpo* 相對 mRNA 的表現值。以對照處理作為空白轉染對照，與對照組相比，DS03-0007（RAG3-424），DS03-0012（RAG3-204），DS03-0014（RAG3-425），DS03-0019（RAG3-453），DS03-0022（RAG3-243），DS03-0024（RAG3-151）和 DS03-0027（RAG3-134）組的 mRNA 相對表現值均不同程度地高於對照組，分別上升了 33.5%，25.5%，51.5%，44.5%，28.5%，26% 和 34.5%。這說明隨機選擇的激活性 saRNA 在

原代小鼠肝細胞中能夠促進 *Thpo* mRNA 的表現。

【0119】 實施例 6. 小鼠體內檢測 *Thpo* saRNA 對 *Thpo* 基因的激活作用

【0120】 (1) 寡核苷酸製劑製作

【0121】 基於已公開的脂質奈米顆粒 (Lipid Nanoparticle, LNP) 製備方法 (參見改進的脂質製劑, 授權公告號: CN 104873464B; 改進的脂質製劑, 授權公告號: CN 102625696B; 脂質製劑, 專利號: US 9394234B2; 改進的脂質製劑, 專利公開號: WO 2010/144740A1; 脂質製劑, 專利號: US 8158601B2; 脂質製劑, US 8802644B2) 進行改進製備 LNP。用所得 LNP 包載寡核苷酸。具體方法簡述如下。

【0122】 *Thpo* siRNA(DS03-432i)和 saRNA(RAG3-151/DS03-0024) 儲液製備: 用 DEPC 水溶解 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (RAG3-151/DS03-0024), 配製理論終濃度為 5 mg/ml 的 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (RAG3-151/DS03-0024) 儲液。取適量的 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (RAG3-151/DS03-0024) 儲液, 用 PBS 稀釋 200 倍, 用於檢測 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (DS03-0024) 濃度。

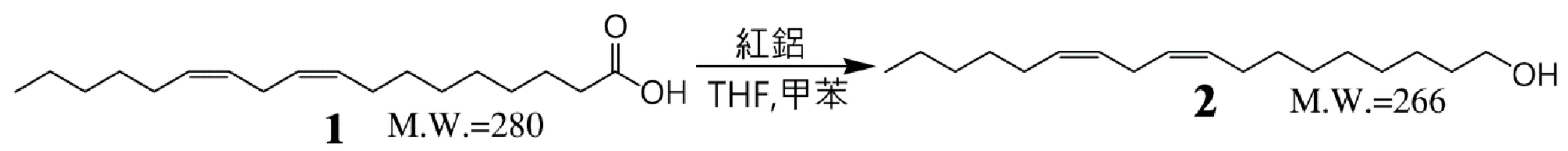
表 7. siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (DS03-0024) 的 RNA 濃度

樣品	RNA 測定濃度 (ng/μl)	稀釋倍數	RNA 儲液濃度 (mg/ml)
DS03-432i	41	200	8.2
DS03-0024	41	200	8.2

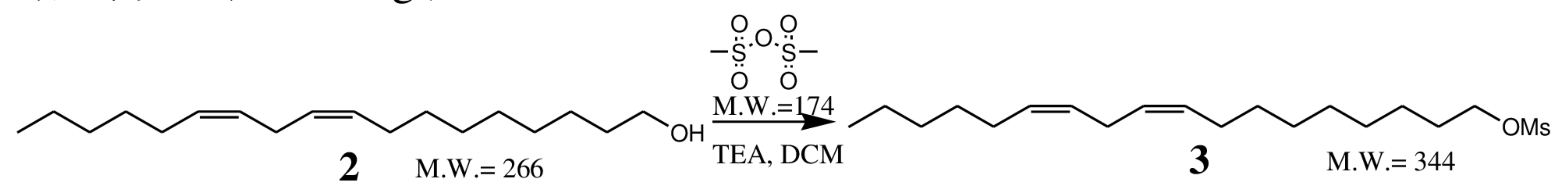
表 8. dsCon2 和 siRNA (DS03-432i) 序列

RNA 雙股體	正義序列 (5'-3')	反義序列 (5'-3')
dsCon2	ACUACUGAGUGACAGUAGATT (SEQ ID NO:303)	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT (SEQ ID NO:304)
DS03-432i	GGACUUUAGCCUGGGAGAATT (SEQ ID NO:305)	UUCUCCCAGGCUAAAGUCCTT (SEQ ID NO:306)

【0123】 製備 D-Lin-MC3 脂質：在專利公開方法(參見脂質製劑，公開號：US 2010/0324120A1)的基礎上，用化學方法如下合成 D-Lin-MC3 脂質。

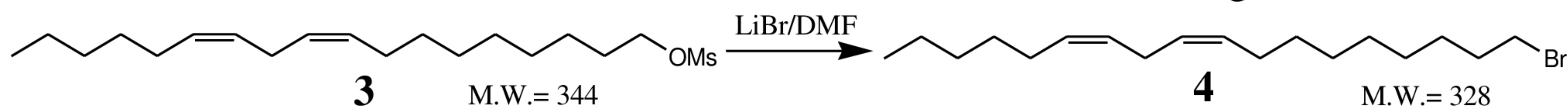


【0124】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氬氣並使用丙酮-乾冰浴冷卻至 0℃。加入 25 g 反應物 1 (亞油酸) 及 THF 300 ml。將 60 ml 的紅鋁(vitride)溶液(70% wt/vol)的甲苯溶液緩慢滴加至反應器中。滴加完畢後，室溫反應 2 小時。取小樣，用 TLC 監測原料反應程度。反應完畢後，緩慢加入飽和的硫酸鈉溶液。滴加完畢後，30 分鐘內滴入 130 ml 乙酸乙酯，並劇烈攪拌。反應液過濾，固體用 90 ml 乙酸乙酯沖洗，合併有機相，濃縮。產物溶解於 80 ml 乙酸乙酯中，用水洗兩次，並用無水硫酸鈉乾燥。過濾，濃縮有機相並用真空泵除去有機溶劑，得到產物 2 (17.49 g)。

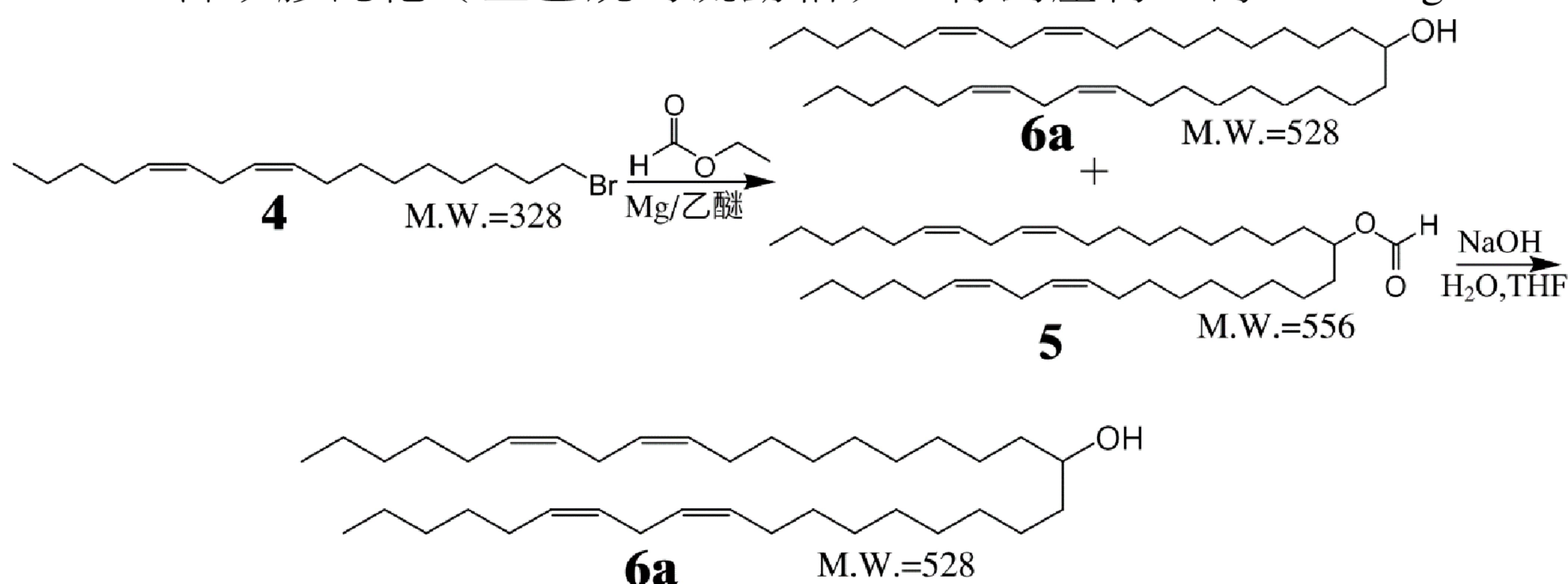


【0125】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氬氣，然後加入 17 g 產物 2 及 150 ml 二氯甲烷，然後加入 40 ml 三乙胺及 1 g 4-二甲胺基吡啶，溶液使用丙酮-乾冰浴冷卻至冷卻至-10℃。30 g 甲烷磺酸酐溶於 45 ml 二氯甲烷中，緩慢滴加至反應器中。反應液滴加完畢，繼續保持 0℃ 反應 1 小時。TLC 監測原料反應程度。反應完畢後，80 ml 冰水加入反應液中，溶液分層，水相用 40 ml 二氯甲烷萃取。合併有機相，有機相

分別用稀鹽酸、水及飽和 NaCl 溶液洗滌，無水硫酸鈉乾燥。過濾，濃縮有機相並用真空泵除去有機溶劑，得到產物 3 (22.3 g)。

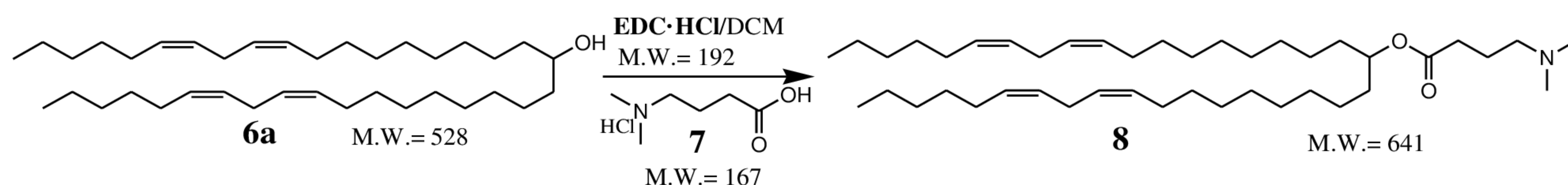


【0126】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氫氣，然後加入 100 ml DMF 及 22 g 產物 3，溶液使用丙酮-乾冰浴冷卻至冷卻至 -10℃。8.5 g LiBr 溶於 80 ml DMF，攪拌並緩慢滴加至反應器中。滴加完畢後，反應液升溫至 45℃，攪拌反應 18-20 小時。TLC 監測原料反應程度。反應完畢後，加入 300 ml 水，並用 240 ml 正己烷萃取，水相繼續用正己烷萃取。合併有機相，並用水及飽和 NaCl 溶液洗滌，無水硫酸鈉乾燥。過濾，濃縮有機相並用真空泵除去有機溶劑，得到粗製物 16.76 g。用 60-120 目矽膠純化（正己烷為流動相），得到產物 4 約 13.86 g。



【0127】 將乾燥 1 L 三口燒瓶通入乾燥氫氣，加裝回流裝置。反應器中加入 2 g 鎂屑及 12 ml 無水乙醚。13 g 產物 4 溶解於 40 ml 無水乙醚中。氫氣保護下，8 ml 該溶液滴加至反應器中，並繼續加入 0.2 ml 二溴甲烷。反應器在水浴中升溫至 40℃。反應開始後，停止加熱，並將剩餘 32 ml 溶液滴加至反應器中，讓混合物保持輕微回流狀態。滴加完畢後，開始加熱使其保持回流狀態（約 45℃）反應 1 小時。取小樣用水淬滅後使用 TLC 監測原料反應程度。原料反應完畢後，反應液用冰浴冷卻至 10℃ 以下，然後緩慢加入甲酸乙酯的乙醚溶液。滴加完畢後，室溫反應 1 小時。然後加入 56 ml 冰水及 10% 的硫酸溶液，分離有機相，水相用乙醚萃取。合併有機相，並用飽和 NaCl 溶液洗滌，無水硫酸鈉

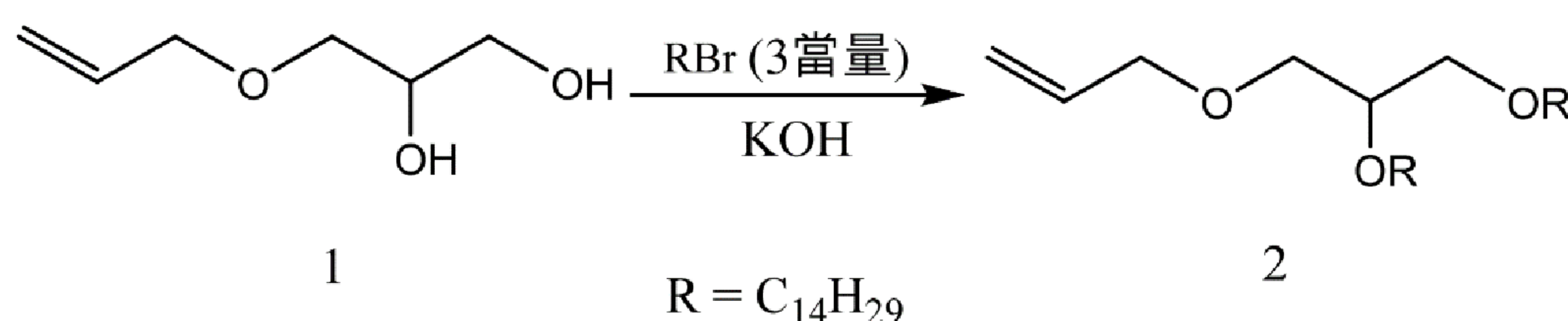
乾燥。過濾，濃縮有機相並用真空泵除去有機溶劑，得到粗製物 13 g。粗製物用 100 ml 85% 乙醇溶解，加入 7 g NaOH 固體，室溫攪拌 24 小時，TLC 監測原料反應程度。反應完全後，用乙醚萃取，合併有機相，並用飽和 NaCl 溶液洗滌。無水硫酸鈉乾燥。過濾，濃縮有機相。粗製物用 60-120 目矽膠純化（4% 乙醚/正己烷），得到產物 6 10.4 g。



【0128】 100 ml 燒瓶中加入反應產物 **6** (3 g) 溶解在二氯甲烷 (24 ml) 中，加入反應物 **7** (4-(二甲基氨基)丁酸鹽酸鹽) (1.1 g)，然後加入二異丙基乙基胺 (1.5 ml) 及 4-二甲胺基吡啶 (0.09 g)。室溫攪拌 5 分鐘後，溶液中加入 EDC·HCl (1.7 g)，室溫攪拌過夜。TLC 監測原料反應程度。反應完全後，溶液用 20 ml 二氯甲烷稀釋。然後用飽和 NaHCO₃、水及飽和 NaCl 溶液洗，無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾，濃縮有機相，得到粗產品約 3.3 g。使用層析法 (1%-5% 甲醇/二氯甲烷作為梯度沖提) 分離得到純的產物 **8** (Dlin-MC3-DMA, 2.9 g)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ =5.44-5.22 (m, 8H), 4.95-4.79 (m, 1H), 2.81-2.63 (m, 4H), 2.36-2.21 (m, 4H), 2.12-1.92 (m, 9H), 1.84-1.67 (m, 2H), 1.48 (d, J=5.4, 4H), 1.36-1.14 (m, 39H), 0.91-0.81 (m, 6H)。

【0129】 製備 PEG-c-DMA

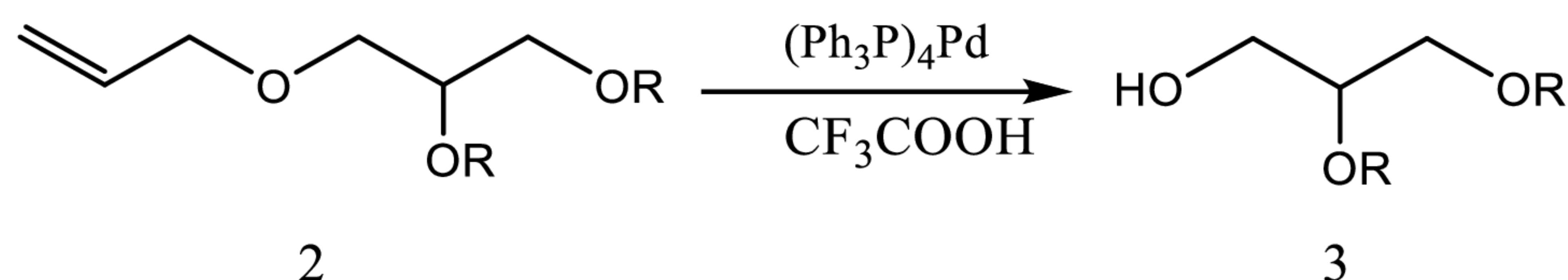
【0130】 用化學方法如下製備 PEG-c-DMA：



【0131】 產物 **2** 的製備

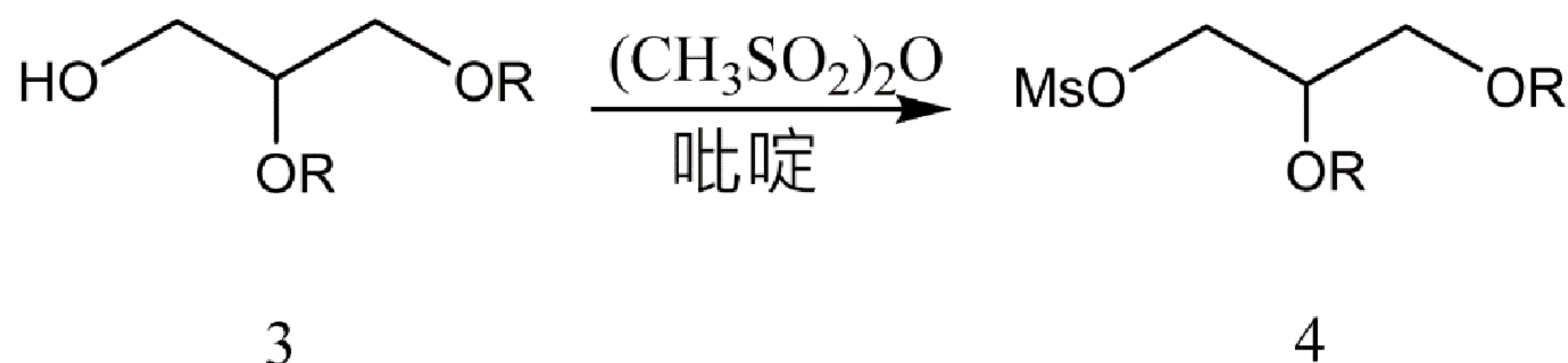
【0132】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氫氣並將 9 g 反應物 **1** (3-烯丙基氧-1,2-丙二醇)，60 g 1-溴代十四烷和 15.5 g 氫氧化鉀的混合物置於 500 mL 無水苯中，回流過夜，並用 Dean-Stark 分流裝置

除水。混合物冷卻到室溫後，用 200mL 無水苯稀釋。有機相分別用水和飽和 NaCl 溶液洗滌，無水硫酸鎂乾燥。真空泵除去有機溶劑，得 53g 清澈黃色油狀物。矽膠管柱純化(粒徑 230-400 mesh，用量 1300 mL)，流動相為 0-5% 乙酸乙酯/正己烷梯度沖提。產物 **2** 為 33g。



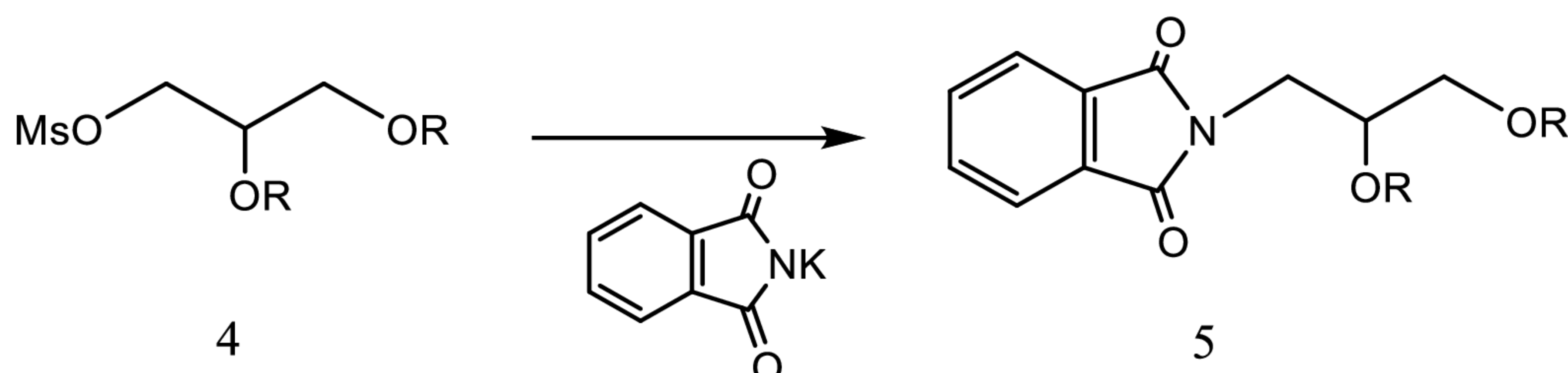
【0133】 產物 **3** 的製備

【0134】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氬氣並將 45 mL 三氟乙酸加入到產物 **2** 的乙醇溶液中（33 g 產物 **2** 溶於 500mL 乙醇）。加入 10 g 四（三苯基磷）鈀後，避光回流過夜。反應完成後，真空泵去除有機溶劑，得棕色油狀物。粗製物用矽膠管柱純化（粒徑 230-400 網目，用量 1500 mL），流動相為 0-1% 甲醇/二氯甲烷梯度沖提。終產物 **3** 呈黃色蠟狀物，得 19 g。



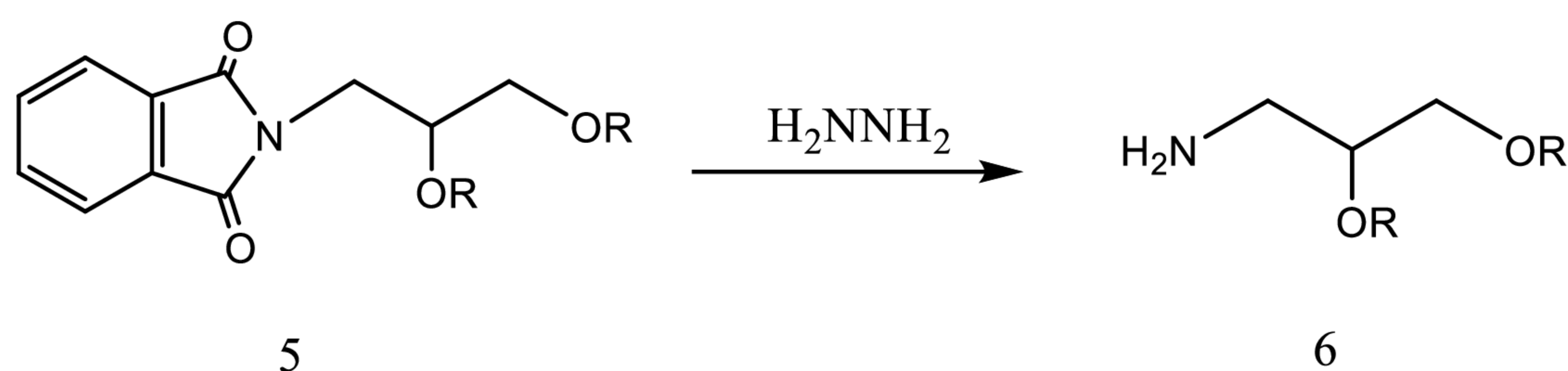
【0135】 產物 **4** 的製備

【0136】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氬氣，在反應器中將 13.8 g 甲磺酸酐溶解於 150 mL 二氯甲烷。並將 6.4 mL 吡啶滴加到反應器中。將 19 g 產物 **3** 溶解在 150 mL 二氯甲烷中並加入到反應體系中。反應混合物在氬氣保護下室溫攪拌過夜。反應完全後，產物用 200 mL 二氯甲烷稀釋，分別用水和飽和 NaCl 溶液洗滌，後用無水硫酸鎂乾燥。旋蒸除去有機溶劑，得黃色蠟狀粗產物 **4** 22.1 g。



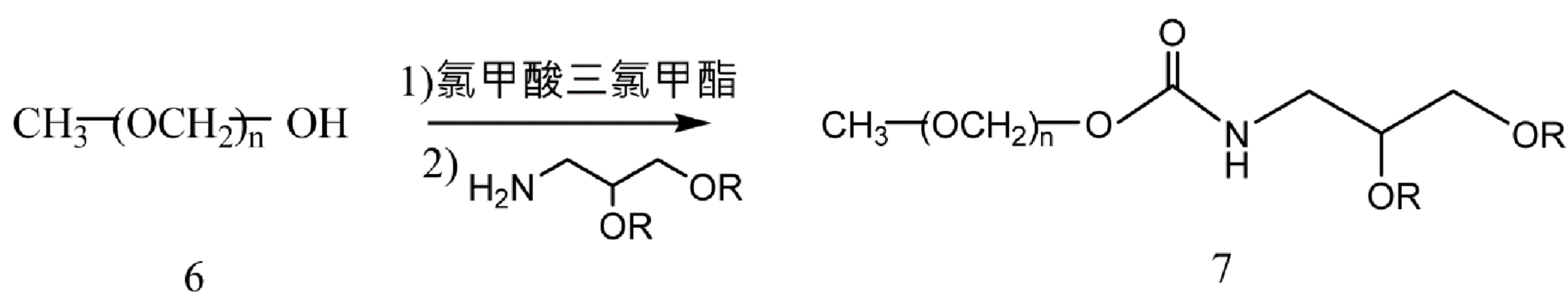
【0137】 產物 **5** 的製備

【0138】 將乾燥 1 L 玻璃反應器通入乾燥氫氣，將 22 g 產物 **4** 與 19 g 酞醯亞胺鉀混合溶於 400 mL DMF 溶液中，升溫到 70℃ 攪拌過夜，得黃色懸濁液。溶液冷卻到室溫後，倒入 800 mL 冰水中。水相用乙酸乙酯洗滌。合併有機相，分別用水和飽和 NaCl 溶液洗滌，後用無水硫酸鎂乾燥。真空泵去除有機溶劑。混合物溶於 500 mL 正己烷中，過濾，再用 100 mL 己烷沖洗。旋蒸去除有機溶劑，得蠟狀物粗製物 20.7 g。粗製物用矽膠管柱純化（粒徑 230-400 網目，用量 600 mL），流動相為 0-5% 乙酸乙酯/正己烷梯度沖提。得純品白色蠟狀產物 **5** 13.4 g。



【0139】 產物 **6** 的製備

【0140】 將 13.4 g 產物 **5** 和 15.8 mL 水合肼溶於 300 mL 乙醇溶液，過夜回流，產生白色固體。反應液冷卻到室溫後，過濾。固體用乙醇（100 mL）清洗兩次。合併有機相，旋蒸去除有機溶劑並溶於 500 mL 氯仿，過濾。固體用 100 mL 氯仿清洗一次。合併有機相並分別用水和飽和 NaCl 溶液洗滌，後用無水硫酸鎂乾燥。真空泵去除有機溶劑，得淺色油狀粗製物 10.6 g。矽膠管柱純化（粒徑 230-400 網目，用量 300 mL），流動相為 0-10% 甲醇/氯仿梯度沖提。得到淺色油狀產物 **6** 10 g。



【0141】 產物 **7** 的製備

【0142】 將 29.5 g 單甲氧基聚乙二醇 2000 溶解與 150 mL 無水苯中，旋蒸去除有機溶劑。將產物溶解於 250 mL 無水二氯甲烷並加入到 1 L 乾燥玻璃反應器中，通入乾燥氬氣。加入 7.3 g 氯甲酸三氯甲酯，室溫攪拌 3 小時。旋蒸除去有機溶劑，加入 150 mL 無水苯，旋蒸去除有機溶劑。將 10 g 產物 **6** 溶於 150 mL 二氯甲烷，然後再加入 3.2 mL 三乙胺，並在氬氣保護下加入到 1 L 反應體系室溫攪拌過夜。反應產物用 200 mL 二氯甲烷稀釋。有機相用 1% HCl 溶液洗滌，然後分別用水，0.1% 碳酸鈉溶液，水和飽和 NaCl 溶液洗滌，最後用無水硫酸鎂乾燥。真空去除有機溶劑後，得淺色漿狀粗製物 46 g。粗製物進行矽膠管柱純化（粒徑 230-400 網目，用量 1600 mL）。流動相為 0-10% 甲醇/氯仿梯度沖提，得產品 PEG-c-DMA 和剩餘反應物，呈白色或淡黃色蠟狀物。蠟狀混合物加入 150 mL 乙醚，溶解未反應的反應物。過濾，並用乙醚洗滌固體兩遍，真空乾燥固體得 32.2 g 產物 **7**。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ : 5.15 (1H, m, NH), 4.21 (2H, m, CH₂), 3.80-3.1 (8H, m), 3.60 (130H, s, OCH₂CH₂O), 3.34 (3H, s, OCH₃), 2.42 (2H, m, NCH₂), 1.49 (4H, m, 2 x CH₂), 1.21 (44H, s, 22 x CH₂), 0.84 (6H, t, 2 x CH₃) ppm。

【0143】 製備脂質儲液：將 D-Lin-MC3 脂質、1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，即 DSPC (Avanti Polar Lipid, 850365)、膽固醇 (Sigma, C3045)、PEG-c-DMA 稱量前在室溫平衡約 30 分鐘。將 D-Lin-MC3 脂質用 100% 乙醇配製成 40 mg/ml 的儲液，膽固醇用 100% 乙醇配製成 20 mg/ml 的儲液，將 DSPC 用 100% 乙醇配製成 20 mg/ml 的儲液。長效脂質用 100% 乙醇配製成 50 mg/ml 的儲液。

【0144】 製備預製空囊泡 (pre-formed vesicles, PFV)：D-Lin-MC3、膽固醇、DSPC、PEG-c-DMA 按 40:40:10:10 的莫耳比用無水乙醇配製成脂質乙醇溶液，各脂質所需量見表 9。待所有脂質溶解後，一邊攪拌一邊將上述脂質乙醇溶液加入到製劑緩衝液 (50 mM 檸檬酸, pH 3.0) 中，使乙醇的終濃度為 30% (v/v)。室溫下，用裝有一層核孔膜 (Nuclepore Membrane) 的 Avanti 脂質體擠出器反復擠出，即得

到粒徑均一的 PFV。經過擠出器的 PFV 用粒徑分析儀測量其粒徑。

表 9. F113 製劑中各脂質所需
總體積：10 ml

乙醇體積：3 ml，乙醇的濃度為 30%（v/v）		
脂質	濃度 (mg/ml)	所需量 (ml)
D-Lin-MC3	40	1.25
DSPC	20	0.462
膽固醇	20	0.904
PEG-c-DMA	50	0.596
補加乙醇		0.286

【0145】 製備 siRNA(DS03-432i)和 saRNA(RAG3-151/DS03-0024) 脂質體製劑：分裝所需體積的 PFV 裝入 15 ml Falcon 管中，35℃ 水浴中預平衡 5 分鐘。分別將 200 μl (8.2mg/ml) 的 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (DS03-0024) 儲液按照 RNA 儲備液/製劑緩衝液/乙醇溶液=200 μl/100 μl/100 μl 的比例製成 0.4 ml 的 siRNA/製劑緩衝液/乙醇溶液和 saRNA/製劑緩衝液/乙醇溶液，然後將 siRNA (DS03-432i) 或 saRNA (RAG3-151/DS03-0024) /製劑緩衝液/乙醇溶液緩慢加入到上述 PFV 中，35℃ 孵育 30 分鐘。用透析袋 MD24 透析上述 siRNA (DS03-432i) 和 saRNA (RAG3-151/DS03-0024) 脂質體製劑，1×磷酸鹽緩衝液（phosphate-buffered saline，PBS）透析過夜，回收透析後產物，即得本實驗中使用的 LNP 包載的寡核苷酸。用 0.2 μm 針頭式過濾器過濾 LNP 包載的寡核苷酸進行過濾除菌，取 20 μl 除菌後產物用於包封率檢測。

【0146】 （2）小鼠尾靜脈注射 LNP 包載的寡核苷酸

【0147】 準備 15 隻 6-8 週齡的雄性 Balb/c 小鼠(北京斯貝福生物技術有限公司)，體重約 25 g。在小鼠動物房適應 3 天後，根據體重隨機分成 3 組，每組 5 隻，分別為對照組 (PBS)、LNP 包載 *Thpo*-siRNA (DS03-432i ， 5 mg/kg) 組和 LNP 包載 *Thpo*-saRNA (RAG3-

151/DS03-0024, 5 mg/kg) 組。按 20 ml/kg 的劑量藉由尾靜脈注射給藥。在給藥後 72 小時, 採用異氟烷麻醉小鼠並進行心臟穿刺採血 200 μ l 用於分析血清 THPO 蛋白濃度。小鼠採血完成後, 採用二氧化碳吸入窒息法犧牲小鼠。其操作方法是將待安樂死的實驗小鼠置於可封閉的實驗箱中, 釋放大量的二氧化碳, 使實驗小鼠窒息而亡。

【0148】 (3) ELISA 檢測小鼠血清 THPO 蛋白

【0149】 取 40 μ l 小鼠的全血室溫靜置 30 分鐘, 離心(4°C, 13000 rpm, 15 分鐘)收集血清。用小鼠 THPO ELISA 套組(R&D Systems, MTP00)檢測血清中 THPO 的含量。按照套組提供的說明書進行操作, 其操作過程簡述如下。準備充足的板條(套組自帶), 每組設兩個複孔, 每孔先加入 50 μ l 的 RD1-23, 再分別加入 50 μ l 的標準品、對照和樣品, 輕拍板條使其混勻, 室溫放置 2 小時。棄掉液體並用 400 μ l 洗滌緩衝液清洗 4 次, 每孔加入 100 μ l 小鼠 Thpo 的偶聯物, 室溫放置 2 小時。棄掉液體並用 400 μ l 洗滌緩衝液清洗 4 次, 每孔加入 100 μ l 受質反應液, 室溫避光放置 30 分鐘。反應結束後, 每孔加入 100 μ l 終止液, 輕拍板條使其混勻, 使用酶標儀(Infinite M200 Pro)測定 450 nm 處吸光值。用已知標準品濃度(4000 pg/ml, 套組自帶)製作保證曲線。用待測樣品的吸光值在減去空白對照(0 pg/ml)的吸光值後根據標準曲線計算出 THPO 蛋白濃度(pg/ml)。

【0150】 (4) 統計學分析

【0151】 連續變量組間差異的比較採用單因素方差分析(ANOVA), 多組間比較採用 Tukey's 多重比較分析。P 值小於 0.05 為具有顯著差異。

【0152】 圖 6 所示為不同處理組小鼠血清 Thpo 蛋白的濃度。與對照組(PBS)相比, LNP 包載 *Thpo-siRNA* (DS03-432i) 組的 Thpo 蛋白含量下降了 16.1%, 具有顯著的統計學意義($P < 0.001$)。這說明 LNP 包載的 *Thpo-siRNA* (DS03-432i) 能夠成功將 *Thpo-siRNA* 遞送至小鼠體內並且可以顯著降低小鼠體內 *Thpo-siRNA* 蛋白的含量, 符合預期並與體外細胞實驗結果一致。LNP 包載 *Thpo-saRNA* (DS03-0024) 組

的 *Thpo* 蛋白含量與對照組相比上升了 32.9%，兩者具有及其顯著的統計學意義 ($P < 0.001$)。這說明 LNP 包載的 *Thpo*-saRNA (DS03-0024) 可以有效地遞送 *Thpo*-saRNA 至小鼠體內並且顯著增加小鼠體內 *Thpo* 蛋白的含量。N (樣本數) = 5；***表示 $P < 0.001$ 。

【0153】 實施例 7. 小鼠尾靜脈遞送 saRNA 增加血清 *Thpo* 水平及周邊血液血小板數量

【0154】 (1) 準備 32 隻 6-8 週齡的雄性 Balb/c 小鼠 (揚州大學比較醫學中心)，體重 28-30 g。在小鼠動物房適應 7 天後，根據體重隨機分成 4 組，每組 8 隻，分別為對照組 (PBS) 和 3 組不同劑量的 LNP 包載 *Thpo*-saRNA (DS03-0024, 1 mg/kg、DS03-0024, 3 mg/kg 和 DS03-0024, 6 mg/kg) 組。按 10 ml/kg 的劑量藉由尾靜脈注射給藥。給藥前 1 天及給藥後第 2、4、6、9 天分別尾靜脈採血 40 μ l 用於分析血清 *Thpo* 濃度及周邊血液血小板數量，給藥後第 17 天採用異氟烷麻醉小鼠並進行心臟穿刺採血 800 μ l 左右用於分析周邊血液血小板數量。小鼠採血完成後，採用二氧化碳吸入窒息法犧牲小鼠。其操作方法是將待安樂死的實驗小鼠置於可封閉的實驗箱中，釋放大量的二氧化碳，使實驗小鼠窒息而亡。

【0155】 (2) 小鼠周邊血液血小板檢測

【0156】 取 5 μ l 全血與 5 μ l 0.01% 的肝素鈉混勻，再加入 90 μ l 生理鹽水稀釋至 100 μ l (1:20 稀釋)，輕柔混勻後，加入至 200 μ l 血小板分離液 (Solarbio, P1620) 上層，250 $\times$ g 室溫離心 15 分鐘，收集 20 μ l 最上層的血小板富集層。加入 80 μ l 的 1 $\times$ FASC 靜置緩衝液 (standing buffer) (R&D Systems, FC001) 於上述收集的上清中，再加入 1 μ l 的 CD41a 抗體 (ThermoFisher, 11-0411-82) 結合血小板，混勻後於室溫避光靜置 30 分鐘。結合完成後，室溫離心 (800 g, 5 分鐘)，用 200 μ l PBS 重懸沉澱，並轉移至酶標檢測板，檢測血小板含量。寡核苷酸製劑的製作和小鼠尾靜脈注射 LNP 包載的寡核苷酸的方法如實施例 6 所述。

【0157】 圖 7 所示為不同處理組 *Thpo* saRNA 增加小鼠血清 *Thpo*

蛋白的濃度。如圖 A 所示，檢測給藥前一天小鼠血清 *Thpo* 蛋白的基線濃度，4 組小鼠血清 *Thpo* 蛋白水平無顯著差異。圖 B 所示為給藥後第 2 天檢測小鼠血清 *Thpo* 的濃度。與對照組（PBS）相比，DS03-0024-3 mg/kg 組的血清 *THPO* 水平呈現上升趨勢，但無統計學顯著性。而 DS03-0024-6 mg/kg 組的 *Thpo* 蛋白濃度上升了 23.9%，具有極其顯著的統計學意義（ $P < 0.0001$ ）。說明 LNP 包載的 *Thpo*-saRNA 可以快速高效地遞送 *Thpo*-saRNA 並且顯著增加小鼠血清 *Thpo* 蛋白的濃度。

【0158】 圖 8 所示為 *Thpo* saRNA 給藥第 6 天後增加小鼠血小板數量。與對照組（PBS）相比，LNP 包載 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，1 mg/kg 和 DS03-0024，3 mg/kg）的這兩組，雖不具有統計學意義但有明顯的上升的趨勢，尤其是 LNP 包載 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，3 mg/kg）組，血小板的數量增加了 88.6%。而 LNP 包載 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）組的血小板數量增加了 138.7%，且具統計學意義（ $P < 0.05$ ）。這說明在給藥 6 天後 LNP 包載的 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）可以增加血小板的數量。

【0159】 圖 9 所示為 *Thpo* saRNA 給藥第 17 天後增加小鼠血小板數量。給藥第 17 天後檢測小鼠的血小板數量，與對照組（PBS）相比，其中兩組 LNP 包載 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，1 mg/kg 和 DS03-0024，3 mg/kg）的血小板數量均有明顯的上升，血小板數量分別增加了 53.8% 和 53.9%，並且具有統計學意義（ $P < 0.05$ ）。而 LNP 包載 *Thpo*-saRNA（DS03-0024，6 mg/kg）組的血小板數量有上升的趨勢。這說明在 saRNA 導致的血小板數量增加可以持續至少 17 天。

【0160】 實施例 8. 靶向人類 *THPO* 基因啟動子的 saRNA 的設計與合成

【0161】 為了篩選能夠激活人類 *THPO* 基因表現的功能性 saRNA，以 *THPO* 1382 bp 的啟動子序列為模板，從 TSS 上游-1382 bp 處開始選定大小為 19 bp 的靶點。然後對靶點序列進行過濾處理，保留靶點序列的標準為：1）GC 含量在 40%~65% 之間；2）不含有 5 個或者多於 5 個的連續同一核苷酸；3）不含多於 3 個的二核苷酸重複

序列；4) 不含多於 3 個的三核苷酸重複序列。過濾後，剩餘的 833 個靶點序列作為候選進入篩選過程。基於這些候選序列，化學合成相應的雙股 saRNA。

【0162】 其中，該實驗中使用的 saRNA 的正義和反義股的長度均為 21 個核苷酸，該 saRNA 的第一核糖核酸鏈（正義股）的 5' 區域的 19 個核苷酸與啟動子靶點序列具有 100% 的同一性，其 3' 末端含有 TT 序列；第二核糖核酸鏈的 5' 區域的 19 個核苷酸與第一核糖核酸鏈序列互補，其 3' 末端含有 TT 序列。將前述 saRNA 的兩條鏈以同等量的莫耳數混合，退火後形成雙股 saRNA。

【0163】 人類 THPO 啟動子序列如下所示，其對應於序列表中 SEQ ID No: 600 從 5' 至 3' 的位置 1 至位置-1382：

-1382 gtccatcagc cgatctcccc ctgcctgggc ccacagcgcc ccccaaaccc
-1332 tcaccaccct ctctcactgc cttagcctgcc tccctacctt ctctctgagg
-1282 tcgctcctca ttcttgtgtt acccaggaca gggacctagc cagaaaccgg
-1232 cagcattccc ctttctgtgg agtgacagta tctccctctc attgtaactt
-1182 atcctcaggc gcattcgaca gtccctctt gctttctcac ccccttctt
-1132 cacccaaggg accctctgcc tctccagccc actcccagcc tcttttctct
-1082 tggttccctg gtcatgcctg cctccctgtc tctgtctct cctcccaca
-1032 cacaccact atcctcccag ctatcccagc accctccttc ctaatcttgg
-982 gagacatctc gtctggctgg acgggaaaat tccaggatct aggccacact
-932 tctcagcaga catgcccac cttggggagg aggaacagga gagagcctga
-882 ggaagttctg ggggacaggg ggatgatggg atcaaggta gccaggaag
-832 cccctgagga cagagactgt ggggagactg ggactgggaa gaaagcaaag
-782 gagctagagc cagggccaaa ggaaaagggg ggccagcagg gaggtatttg
-732 cgggggaggt ccagcagctg tctttcctaa gacagggaca catgggcctg
-682 gttattctc ttgtcacatg tggaacggtg ggagatggaa gacggagaca
-632 gaacaagcaa aggagggccc tgggcacaga ggtctgtgtg ttagccatc
-582 taagccactg gaccccagca gacgagcacc taagctcagg cttaacccag
-532 tgcacgtgtg cgcacataca tgtgccccgc acctgacagt ccactcaacc

-482 cgtccaaacc ctttcccat aacaccaacc cataacagga gatttctctc
-432 atgtgggcaa tatccgtgtt cccacttcga aagggggaat gacaagatag
-382 gactccctag gggattacag aaagaaaagc aggaaagcaa gcatcctgtt
-332 ggatttcagc agcaggtatg atgtccaggg aaaagaaatt tggatagcca
-282 gggagtgaaa accccaccaa tcttaaacia gacctctgtg cttcttcccc
-232 agcaacacaa atgtcctgcc agattcctcc tggaaaaaaa cttctgctcc
-182 tgtccccctc caggtcccag gttgcccatg tccaggaaaa gatggatccc
-132 cctatccaaa tcttctccgt ggtgtgtgtg ggtggaggag tggaccctgg
-82 tccaggcagg ggctccaggg aagagaaggc gtcacttccg ggggccttca
-32 ccagtgtctg gtggctccct tctctgattg gg

【0164】 實施例 9. 靶向人類 *THPO* 啟動子的 saRNA 的高通量篩選

【0165】 (1) 細胞培養和轉染

【0166】 人類肝癌細胞 HepG2 (ATCC) 培養在 MEM 培養基 (Gibco) 中，培養基含有 10% 小牛血清 (Sigma-Aldrich) 和 1% 青黴素/鏈黴素 (Gibco)。細胞在 5% CO₂，37℃ 條件下培養。HepG2 細胞以每孔 5000 個鋪板到 96 孔板中，依照製造商的說明，使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 25 nM 濃度轉染小型活化 RNA，轉染時間為 72 小時，每種處理使用 2 個複孔。

【0167】 (2) 單步驟 RT-qPCR

【0168】 轉染結束後，棄掉培養基，每孔加入 150 µl PBS 清洗一次，丟棄 PBS，每孔加入 50 µl 細胞裂解液，室溫孵育 5 分鐘。每孔取 1 µl 細胞裂解液使用單步驟 TB Green™ PrimeScrip™ RT-PCR 套組 II (Takara, RR086A)。在 ABI 7500 快速即時 (Fast Real-time) PCR 系統 (Applied Biosystems) 進行 qPCR 分析，每個樣本重複 3 個複孔擴增，PCR 反應條件見表 1。

表 10 .PCR 反應製備

試劑	體積
2 × 單步驟 TB Green RT-PCR 緩衝液 4	2.5 μl
PrimeScript 單步驟酶混合物 2	0.2 μl
正向和反向引子混合物（5μM）	0.4 μl
無 RNase dH ₂ O	1.4 μl
粗製裂解物（RNA）	0.5 μl
總計	5 μl

【0169】 反應條件為階段 1 反轉錄反應：42℃，5 分鐘；95℃ 10 秒；階段 2 PCR 反應：95℃ 5 秒，60℃ 20 秒，擴增 45 個循環。以 *TBP* 為內部參考基因。*THPO* 及 *TBP* 所用 PCR 引子見表 10，其中 *THPO* 用 *THPO* F1/R1 引子對擴增。

表11. RT-qPCR分析的引子序列

引子名稱	序列號	序列 (5'-3')
<i>THPO</i> F	SEQ ID NO : 309	TCGTGACTCCCATGTCCTTC
<i>THPO</i> R	SEQ ID NO : 310	TGCCTTGGTCTCCTCCATCT
<i>TBP</i> F	SEQ ID NO : 311	TGCTCACCCACCAACAATTTAG
<i>TBP</i> R	SEQ ID NO : 312	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG
<i>HPRT1</i> F	SEQ ID NO : 313	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG
<i>HPRT1</i> R	SEQ ID NO : 314	TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC

【0170】 為了計算某個 saRNA 轉染樣本的 *THPO* 目的基因)的相對於對照處理 (Mock) 的表現值 (E_{rel})，用實施例 3 中的公式 2 代入目的基因及 1 個內部參考基因的 Ct 值計算：

$$E_{rel} = 2^{(Ct_{Tm}-Ct_{Ts})} / 2^{(Ct_{Rm}-Ct_{Rs})} \quad (\text{公式 2})$$

其中，CtTm 為來自 Mock 樣本的目的基因的 Ct 值，CtTs 為來自 saRNA 處理樣本的目的基因的 Ct 值，CtRm 為來自 Mock 處理樣本的內部參考基因的 Ct 值，CtRs 為來自 saRNA 處理樣本的內部參考基因的 Ct 值。

【0171】 (3) 功能性 saRNA 篩選

【0172】 為了獲得能夠激活 *THPO* 轉錄的 saRNA，用上述 833 個 saRNA 分別轉染 HepG2 細胞，轉染濃度為 25 nM，轉染 72 小時後以如上該相同的方法，裂解細胞並進行單步驟 RT-qPCR 分析得到每個 saRNA 處理樣本的 *THPO* 基因的相對 (與對照處理組比較) 表現值。如表 11 所示，有 158 (19%) 個 saRNA 顯示出高度激活作用，243 (29.2%) 個 saRNA 顯示出輕度激活作用，有 432 (51.8%) 個 saRNA 對 *THPO* 的表現不產生影響。激活的最大幅度為 5.15 倍，最大抑制幅度為 0.09 倍，這些具有激活活性的 saRNA 被稱為激活性 saRNA。

表12. 人類*THPO* saRNA高通量篩選結果統計

saRNA 活性分類	<i>THPO</i> mRNA 改變幅度的 log ₂ 值(倍數)	saRNA 數量	百分比
高度激活	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤ 2.36 (5.15)	158	19%
輕度激活	≥ 0.13 (1.10) ~ < 0.58 (1.50)	243	29.2%
無激活作用	< 0.13 (1.10)	432	51.8%
總計		833	100%

【0173】 如圖 10 所示，進一步顯示了人類 *THPO* saRNA 的 *THPO* 表現改變從最高到最低排序。其中 *THPO* 活性 saRNA 序列以及 *THPO* mRNA 表現改變，如表 13 所示。

表 13. 人類活性 saRNA 序列、其靶點序列以及其導致的 THPO mRNA 表現改變

saRNA	靶點序列 (5'-3')	saRNA 正義序列 (5'-3')	saRNA 反義序列 (5'-3')	THPO mRNA 相對表現改變倍數
RAG3A-889	AGCCTGAGGAAGTTCTGGG (SEQ ID NO : 606)	AGCCUGAGGAAGUUCUGGGTT (SEQ ID NO : 1048)	CCCAGAACUCCUCAGGCUTT (SEQ ID NO : 1490)	5.1
RAG3A-723	TCCAGCAGCTGTCTTTCCT (SEQ ID NO : 607)	UCCAGCAGCUGUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1049)	AGGAAAGACAGCUGCUGGATT (SEQ ID NO : 1491)	4.1
RAG3A-1069	ATGCCCTGCCCTCCCTGTCTC (SEQ ID NO : 608)	AUGCCUGCCUCCUGUCUCTT (SEQ ID NO : 1050)	GAGACAGGAGGCAGGCAUTT (SEQ ID NO : 1492)	4
RAG3A-541	TTAACCCAGTGACGTGTG (SEQ ID NO : 609)	UUAACCCAGUGCACGUGGTT (SEQ ID NO : 1051)	CACACGUGCACUGGGUUAATT (SEQ ID NO : 1493)	3.4
RAG3A-480	TCCAAACCCCTTTCCTCCATA (SEQ ID NO : 610)	UCCAAACCCUUCCTCCAUATT (SEQ ID NO : 1052)	UAUGGGGAAAGGGUUGGATT (SEQ ID NO : 1494)	3.1
RAG3A-980	GACATCTCGTCTGGCTGGA (SEQ ID NO : 611)	GACAUCUGCUGGCGUGGATT (SEQ ID NO : 1053)	UCCAGCCAGACGAGAUGUCTT (SEQ ID NO : 1495)	3.1
RAG3A-462	AACACCAACCCATAACAGG (SEQ ID NO : 612)	AACACCAACCCAUACAGGTT (SEQ ID NO : 1054)	CCUGUUAUGGGUUGGUGUUTT (SEQ ID NO : 1496)	3
RAG3A-787	CAAAGGAGCTAGAGCCAGG (SEQ ID NO : 613)	CAAGGAGCUAGAGCCAGGTT (SEQ ID NO : 1055)	CCUGGCUCUAGCUCUUGGTT (SEQ ID NO : 1497)	2.9
RAG3A-232	AGCAACACAAATGTCCTGC (SEQ ID NO : 614)	AGCAACACAAUGUCCUGCTT (SEQ ID NO : 1056)	GCAGGACAUUUGUGUUGCUTT (SEQ ID NO : 1498)	2.9
RAG3A-727	GAGGTCCAGCAGCTGTCTT (SEQ ID NO : 615)	GAGGUCCAGCAGCUGUCUUTT (SEQ ID NO : 1057)	AAGACAGCUGCUGGACCUCTT (SEQ ID NO : 1499)	2.9
RAG3A-542	CTTAACCCAGTGCACGTGT (SEQ ID NO : 616)	CUUAACCCAGUGCACGUGUTT (SEQ ID NO : 1058)	ACACGUGCACUGGGUUAAGTT (SEQ ID NO : 1500)	2.8
RAG3A-748	AGCAGGAGGTATTTGCGG (SEQ ID NO : 617)	AGCAGGAGGUUUUGCGGTT (SEQ ID NO : 1059)	CCGCAAAUACCUCCUGCUTT (SEQ ID NO : 1501)	2.8
RAG3A-540	TAACCCAGTGCACGTGTGC (SEQ ID NO : 618)	UAACCCAGUGCACGUGGCTT (SEQ ID NO : 1060)	GCACACGUGCACUGGGUUAATT (SEQ ID NO : 1502)	2.8
RAG3A-1219	TCTGTGGAGTGACAGTATC (SEQ ID NO : 619)	UCUGUGGAGUGACAGUAUCTT (SEQ ID NO : 1061)	GAUACUGUCACUCCACAGATT (SEQ ID NO : 1503)	2.8

RAG3A-487	CAACCCGTCCAAACCCTTT (SEQ ID NO : 620)	CAACCCGUCCAAACCCUUUTT (SEQ ID NO : 1062)	AAAGGUUUGGACGGUUGTT (SEQ ID NO : 1504)	2.7
RAG3A-559	GAGCACCTAAGCTCAGGCT (SEQ ID NO : 621)	GAGACCUAAGCUCAGGCUTT (SEQ ID NO : 1063)	AGCCUGAGCUUAGGUGCUCTT (SEQ ID NO : 1505)	2.7
RAG3A-1308	CCTGCCTCCCTACCTTCTC (SEQ ID NO : 622)	CCUGCCUCCCUACCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1064)	GAGAGGUAGGGAGGCAGGTT (SEQ ID NO : 1506)	2.7
RAG3A-24	TGGTGGCTCCCTTCTCTGA (SEQ ID NO : 623)	UGGUGGCUCUCCUUCUCUGATT (SEQ ID NO : 1065)	UCAGAGAAGGGAGCCACCATT (SEQ ID NO : 1507)	2.6
RAG3A-1169	TTCGACAGTCCCTCTTGC (SEQ ID NO : 624)	UUCGACAGUCCCCUCUUGCTT (SEQ ID NO : 1066)	GCAAGAGGGACUGUCGAATT (SEQ ID NO : 1508)	2.6
RAG3A-1256	GACAGGGACCTAGCCAGAA (SEQ ID NO : 625)	GACAGGACCUAGCCAGAATT (SEQ ID NO : 1067)	UUCUGGCUAGGUCCCCUGUCTT (SEQ ID NO : 1509)	2.6
RAG3A-522	CGCACATACATGTGCCCG (SEQ ID NO : 626)	CGCACAUACAUGUGCCCCGTT (SEQ ID NO : 1068)	CGGGGCACAUGUAUGUGCGTT (SEQ ID NO : 1510)	2.6
RAG3A-851	TCAAGGTCAGGCCAGGAAG (SEQ ID NO : 627)	UCAAGGUCAGGCCAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1069)	CUUCCUGGCCUGACCUUGATT (SEQ ID NO : 1511)	2.6
RAG3A-1096	AGCCTCCTTTCTCTTGTT (SEQ ID NO : 628)	AGCCUCCUUUCUUGGUUTT (SEQ ID NO : 1070)	AACCAAGAGAAAGGAGGCUTT (SEQ ID NO : 1512)	2.5
RAG3A-227	CACAAATGTCCTGCCAGAT (SEQ ID NO : 629)	CACAAAUGUCCUGCCAGAUTT (SEQ ID NO : 1071)	AUCUGGCAGGACAUUUGUUTT (SEQ ID NO : 1513)	2.5
RAG3A-1178	TCAGGCGCATTCGACAGTC (SEQ ID NO : 630)	UCAGGCGCAUUCGACAGUCTT (SEQ ID NO : 1072)	GACUGUCGAAUGCGCCUGATT (SEQ ID NO : 1514)	2.5
RAG3A-544	GGCTTAACCCAGTGACGT (SEQ ID NO : 631)	GGCUUAACCCAGUGCACGUTT (SEQ ID NO : 1073)	ACGUGCACUGGGUUAAGCCTT (SEQ ID NO : 1515)	2.5
RAG3A-836	GAAGCCCCTGAGGACAGAG (SEQ ID NO : 632)	GAAGCCCCUGAGGACAGAGTT (SEQ ID NO : 1074)	CUCUGUCCUCAGGGGCUUCTT (SEQ ID NO : 1516)	2.4
RAG3A-569	CCCAGCAGACGAGCACCTA (SEQ ID NO : 633)	CCCAGCAGACGAGCACCUATT (SEQ ID NO : 1075)	UAGGUGCUCGUCUGCGGTT (SEQ ID NO : 1517)	2.4
RAG3A-1320	CTCACTGCCTAGCCTGCCT (SEQ ID NO : 634)	CUCACUGCCUAGCCUGCCUTT (SEQ ID NO : 1076)	AGGCAGGCUAGGCAGUGAGTT (SEQ ID NO : 1518)	2.4
RAG3A-1319	TCACTGCCTAGCCTGCCTC (SEQ ID NO : 635)	UCACUGCCUAGCCUGCCUCTT (SEQ ID NO : 1077)	GAGGCAGGCUAGGCAGUGATT (SEQ ID NO : 1519)	2.3

RAG3A-290	GATAGCCAGGGAGTGAAAA (SEQ ID NO : 636)	GAUAGCCAGGAGUGAAAATT (SEQ ID NO : 1078)	UUUUCACUCCUGGCUAUCTT (SEQ ID NO : 1520)	2.3
RAG3A-1074	TGGTCAATGCCTGCCTCCCT (SEQ ID NO : 637)	UGGUCAUGCCUGCCUCCUUTT (SEQ ID NO : 1079)	AGGAGGCAGGCAUGACCATT (SEQ ID NO : 1521)	2.2
RAG3A-279	AGTGAAACCCACCAATC (SEQ ID NO : 638)	AGUGAAAACCCACCAAUCTT (SEQ ID NO : 1080)	GAUUGGUGGGUUUUCACUTT (SEQ ID NO : 1522)	2.2
RAG3A-521	GCACATACATGTGCCCCGC (SEQ ID NO : 639)	GCACAUACAUGUGCCCGCTT (SEQ ID NO : 1081)	GCGGGCACAUUAUGUGCTT (SEQ ID NO : 1523)	2.2
RAG3A-25	CTGGTGGCTCCCTTCTCTG (SEQ ID NO : 640)	CUGGUGGCUCUCCUUCUCUGTT (SEQ ID NO : 1082)	CAGAGAAGGGAGCCACGATT (SEQ ID NO : 1524)	2.1
RAG3A-62	AAGAGAAGCGTCACTTCC (SEQ ID NO : 641)	AAGAGAAGGCGUCACUUCCTT (SEQ ID NO : 1083)	GGAAGUGACGCCUUCUCUUTT (SEQ ID NO : 1525)	2.1
RAG3A-852	ATCAAGGTCAGGCCAGGAA (SEQ ID NO : 642)	AUCAAGGUCAGGCCAGGAATT (SEQ ID NO : 1084)	UUCCUGGCCUGACCUUGAUTT (SEQ ID NO : 1526)	2.1
RAG3A-931	CTCAGCAGACATGCCCATC (SEQ ID NO : 643)	CUCAGCAGACAUGCCCAUCTT (SEQ ID NO : 1085)	GAUGGGCAUGUCUGCUGAGTT (SEQ ID NO : 1527)	2.1
RAG3A-892	GAGAGCCTGAGGAAGTTCT (SEQ ID NO : 644)	GAGAGCCUGAGGAAGUUCUTT (SEQ ID NO : 1086)	AGAACUCCUCAGGCUCUCTT (SEQ ID NO : 1528)	2
RAG3A-235	CCCAGCAACACAAATGTCC (SEQ ID NO : 645)	CCCAGCAACACAAUGUCCTT (SEQ ID NO : 1087)	GGACAUUUGUGUUGCUGGGTT (SEQ ID NO : 1529)	2
RAG3A-1246	TAGCCAGAAACCGGCAGCA (SEQ ID NO : 646)	UAGCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO : 1088)	UGCUGCCGGUUUCUGGCUATT (SEQ ID NO : 1530)	2
RAG3A-19	GCTCCCTTCTCTGATTGGG (SEQ ID NO : 647)	GCUCCCUUCUCUGAUUGGGTT (SEQ ID NO : 1089)	CCCAAUACAGAGAAGGAGCTT (SEQ ID NO : 1531)	2
RAG3A-1322	CTCTCACTGCCCTAGCCTGC (SEQ ID NO : 648)	CUCUCACUGCCUAGCCUGCTT (SEQ ID NO : 1090)	GCAGGCUAGGCAGUGAGAGTT (SEQ ID NO : 1532)	2
RAG3A-795	GAAGAAAGCAAAGGAGCTA (SEQ ID NO : 649)	GAAGAAAGCAAAGGAGCUATT (SEQ ID NO : 1091)	UAGCUCCUUUGCUUUCUUCTT (SEQ ID NO : 1533)	2
RAG3A-515	ACATGTGCCCCGCACCTGA (SEQ ID NO : 650)	ACAUGUGCCCCGCACCUGATT (SEQ ID NO : 1092)	UCAGGUGCGGGGCACAUGUTT (SEQ ID NO : 1534)	2
RAG3A-128	TCCAAATCTTCTCCGTGGT (SEQ ID NO : 651)	UCCAAAUUCUUCUCCGUGGUTT (SEQ ID NO : 1093)	ACCACGGAGAAGAUUUGGATT (SEQ ID NO : 1535)	2

RAG3A-661	GGAACGGTAGGAGATGGAA (SEQ ID NO : 652)	GGAACGGUAGGAGAUGGAATT (SEQ ID NO : 1094)	UUCAUCUCCUACCGUUCCTT (SEQ ID NO : 1536)	2
RAG3A-125	AAATCTTCTCCGTGGTGTG (SEQ ID NO : 653)	AAAUUUUCCGUGGUGUGTT (SEQ ID NO : 1095)	CACACCAGGAGAAAUUUTT (SEQ ID NO : 1537)	2
RAG3A-1241	AGAAACCGGCAGCATTCCTC (SEQ ID NO : 654)	AGAAACCGGCAGCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1096)	GGGAAUGCUGCCGGUUUCUTT (SEQ ID NO : 1538)	2
RAG3A-463	TAACACCAACCCATAACAG (SEQ ID NO : 655)	UAACACCAACCCAUAAACAGTT (SEQ ID NO : 1097)	CUGUUAUGGGUUGGUGUUAATT (SEQ ID NO : 1539)	2
RAG3A-434	TCATGTGGGCAATATCCGT (SEQ ID NO : 656)	UCAUGUGGGCAAUUCCGUTT (SEQ ID NO : 1098)	ACGGAUAUUGCCCAUGATT (SEQ ID NO : 1540)	1.9
RAG3A-520	CACATACATGTGCCCCGCA (SEQ ID NO : 657)	CACUAACAUGUGCCCCGCATT (SEQ ID NO : 1099)	UGC GGGCACAUGUAUGUGTT (SEQ ID NO : 1541)	1.9
RAG3A-499	TGACAGTCCACTCAACCCG (SEQ ID NO : 658)	UGACAGUCCACUCAACCCGTT (SEQ ID NO : 1100)	CGGGUUGAGUGGACUGUCATT (SEQ ID NO : 1542)	1.9
RAG3A-668	CACATGTGGAACGGTAGGA (SEQ ID NO : 659)	CACAUGUGGAACGGUAGGATT (SEQ ID NO : 1101)	UCCUACCGUUCACAUUGGTT (SEQ ID NO : 1543)	1.9
RAG3A-591	GTAGCCATCTAAGCCACTG (SEQ ID NO : 660)	GUAGCCAUCUAAGCCACUGTT (SEQ ID NO : 1102)	CAGUGGCUUAGAUGGCUACTT (SEQ ID NO : 1544)	1.9
RAG3A-1209	GACAGTATCTCCCTCTCAT (SEQ ID NO : 661)	GACAGUAUCUCCCUCAUTT (SEQ ID NO : 1103)	AUGAGAGGGAGAUACUGUCTT (SEQ ID NO : 1545)	1.9
RAG3A-1257	GGACAGGGACCTAGCCAGA (SEQ ID NO : 662)	GGACAGGGACCUAGCCAGATT (SEQ ID NO : 1104)	UCUGGCUAGGUCCCUGUCCTT (SEQ ID NO : 1546)	1.9
RAG3A-1170	ATTCGACAGTCCCCCTCTTG (SEQ ID NO : 663)	AUUCGACAGUCCCCCUUGTT (SEQ ID NO : 1105)	CAAGAGGGGACUGUCGAAUTT (SEQ ID NO : 1547)	1.9
RAG3A-39	GCCTTCACCAGTGTCTGGT (SEQ ID NO : 664)	GCCUUCACCAGUGUCUGGUTT (SEQ ID NO : 1106)	ACCAGACACUGGUGAAGGCTT (SEQ ID NO : 1548)	1.9
RAG3A-431	TGTGGGCAATATCCGTGT (SEQ ID NO : 665)	UGUGGGCAAUUCCGUGUUTT+B50 (SEQ ID NO : 1107)	AACACGGAUAUUGCCCACATT (SEQ ID NO : 1549)	1.9
RAG3A-1080	GTTCCTTGGTCATGCCTGC (SEQ ID NO : 666)	GUUCCCCUGGUCAUGCCUGCTT (SEQ ID NO : 1108)	GCAGGCAUGACCAGGGAATT (SEQ ID NO : 1550)	1.9
RAG3A-1266	TGTTACCCAGGACAGGGAC (SEQ ID NO : 667)	UGUUAACCCAGGACAGGGACTT (SEQ ID NO : 1109)	GUCCCUGUCCUGGGUAAACATT (SEQ ID NO : 1551)	1.9

RAG3A-1202	TCTCCCTCTCATGTGTAAC T (SEQ ID NO : 668)	UCUCCCUCAUUGUAACUTT (SEQ ID NO : 1110)	AGUACAUGAGAGGGAGATT (SEQ ID NO : 1552)	1.9
RAG3A-979	ACATCTCGTCTGGCTGGAC (SEQ ID NO : 669)	ACAUCUCGUCUGGCUGGACTT (SEQ ID NO : 1111)	GUCCAGCCAGACGAGAU GUTT (SEQ ID NO : 1553)	1.9
RAG3A-343	AGCATCCTGTGTGGATTTC A (SEQ ID NO : 670)	AGCAUCCUGUUGGAUUCATT (SEQ ID NO : 1112)	UGAAAUCCAACAGGAUGCUTT (SEQ ID NO : 1554)	1.9
RAG3A-430	GTGGGCAATATCCGTGTTC (SEQ ID NO : 671)	GUGGGCAUAUCCGUGUUCTT (SEQ ID NO : 1113)	GAACACGGAUAUUGCCCAC TT (SEQ ID NO : 1555)	1.9
RAG3A-319	AGGTATGATGTCCAGGGAA (SEQ ID NO : 672)	AGGUAUGAUGUCCAGGGAATT (SEQ ID NO : 1114)	UUCCCUGGACAUCAUACCUTT (SEQ ID NO : 1556)	1.8
RAG3A-612	TGGGCACAGAGGTCTGTGT (SEQ ID NO : 673)	UGGGCACAGAGGUCUGUGUTT (SEQ ID NO : 1115)	ACACAGACCUCUGUGCCACTT (SEQ ID NO : 1557)	1.8
RAG3A-454	CCCATACAGGAGATTCT (SEQ ID NO : 674)	CCCAUACAGGAGAUUUCUTT (SEQ ID NO : 1116)	AGAAAUCCUGUUUAUGGGTT (SEQ ID NO : 1558)	1.8
RAG3A-1312	CTAGCCTGCCCTCCCCTACCT (SEQ ID NO : 675)	CUAGCCUGCCUCCCUACCUTT (SEQ ID NO : 1117)	AGGUAGGGAGGCAGGCUAGTT (SEQ ID NO : 1559)	1.8
RAG3A-342	GCATCCTGTGTGGATTTCAG (SEQ ID NO : 676)	GCAUCCUGUUGGAUUUCAGTT (SEQ ID NO : 1118)	CUGAAAUCCAACAGGAUGCTT (SEQ ID NO : 1560)	1.8
RAG3A-1118	TCTGCCCTCTCCAGCCCAC T (SEQ ID NO : 677)	UCUGCCUCUCCAGCCCACUTT (SEQ ID NO : 1119)	AGUGGGCUGGAGAGGCAGATT (SEQ ID NO : 1561)	1.8
RAG3A-970	CTGGCTGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO : 678)	CUGGCUGGACGGGAAA AUUTT (SEQ ID NO : 1120)	AAUUUCCCGUCCAGCCAGTT (SEQ ID NO : 1562)	1.8
RAG3A-1133	TCACCCAAGGGACCCCTCTG (SEQ ID NO : 679)	UCACCCAAGGACCCUCUGTT (SEQ ID NO : 1121)	CAGAGGUCCCUUGGGUGATT (SEQ ID NO : 1563)	1.8
RAG3A-689	GGGCCTGGTTATTCCTCTT (SEQ ID NO : 680)	GGGCCUGGUUAUUCUCUUTT (SEQ ID NO : 1122)	AAGAGGAUAACACAGGCCCTT (SEQ ID NO : 1564)	1.8
RAG3A-1321	TCTCACTGCCCTAGCCTGCC (SEQ ID NO : 681)	UCUCACUGCCUAGCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1123)	GGCAGGCUAGGCAGUGAGATT (SEQ ID NO : 1565)	1.8
RAG3A-662	TGGAACGGTAGGAGATGGA (SEQ ID NO : 682)	UGGAACGGUAGGAGAU GGATT (SEQ ID NO : 1124)	UCCAUCUCCUACCGUUC CATT (SEQ ID NO : 1566)	1.8
RAG3A-817	ACTGTGGGAGACTGGGAC (SEQ ID NO : 683)	ACUGUGGGAGACUGGGACTT (SEQ ID NO : 1125)	GUCCCAGUCUCCCCACAGUTT (SEQ ID NO : 1567)	1.8

RAG3A-1242	CAGAAACCGGCAGCATTC (SEQ ID NO : 684)	CAGAAACCGGCAGCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1126)	GGAAUGCUGCCGGUUUCUGTT (SEQ ID NO : 1568)	1.8
RAG3A-278	GTGAAACCCACCAATCT (SEQ ID NO : 685)	GUGAAACCCACCAUCUTT (SEQ ID NO : 1127)	AGAUUGGUGGGUUUUCACTT (SEQ ID NO : 1569)	1.8
RAG3A-1210	TGACAGTATCTCCCTCTCA (SEQ ID NO : 686)	UGACAGUAUCUCCUCUCATT (SEQ ID NO : 1128)	UGAGAGGGAGAUACUGUCATT (SEQ ID NO : 1570)	1.8
RAG3A-1084	CTTGGTCCCCTGGTCATGC (SEQ ID NO : 687)	CUUGGUUCCCUUGGUC AUGCTT (SEQ ID NO : 1129)	GCAUGACCAGGGAACCAAGTT (SEQ ID NO : 1571)	1.8
RAG3A-1166	GACAGTCCCCTCTTGCTTT (SEQ ID NO : 688)	GACAGUCCCUUCUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1130)	AAAGCAAGAGGGGACUGUCTT (SEQ ID NO : 1572)	1.8
RAG3A-982	GAGACATCTCGTCTGGCTG (SEQ ID NO : 689)	GAGACAUCUCGUCUGGCUGTT (SEQ ID NO : 1131)	CAGCCAGACGAGAUGUCUCTT (SEQ ID NO : 1573)	1.8
RAG3A-171	AGGTCCCAGGTTGCCCATG (SEQ ID NO : 690)	AGGUCCCAGGUUGCCCAUGTT (SEQ ID NO : 1132)	CAUGGGCAACCUGGGACCUTT (SEQ ID NO : 1574)	1.8
RAG3A-256	ACAAGACCTCTGTGCTTCT (SEQ ID NO : 691)	ACAAGACCUCUGUGCUUUCTT (SEQ ID NO : 1133)	AGAAGCACAGAGGUUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1575)	1.7
RAG3A-563	AGACGAGCACCTAAGCTCA (SEQ ID NO : 692)	AGACGAGCACCUAAGCUCATT (SEQ ID NO : 1134)	UGAGCUUAGGUGCUCGUCUTT (SEQ ID NO : 1576)	1.7
RAG3A-1176	AGGCGCATTCGACAGTCCC (SEQ ID NO : 693)	AGGCGCAUUCGACAGUCCCTT (SEQ ID NO : 1135)	GGGACUGUCGAAUGGCCUTT (SEQ ID NO : 1577)	1.7
RAG3A-707	CCTAAGACAGGGACACATG (SEQ ID NO : 694)	CCUAAGACAGGGACACAUGTT (SEQ ID NO : 1136)	CAUGUGUCCUGUCUUAAGTT (SEQ ID NO : 1578)	1.7
RAG3A-561	ACGAGCACCTAAGCTCAGG (SEQ ID NO : 695)	ACGAGCACCUAAGCUCAGGTT (SEQ ID NO : 1137)	CCUGAGCUUAGGUGCUCGUTT (SEQ ID NO : 1579)	1.7
RAG3A-504	GCACCTGACAGTCCACTCA (SEQ ID NO : 696)	GCACCUGACAGUCCACUCATT (SEQ ID NO : 1138)	UGAGUGGACUGUCAGGUGCTT (SEQ ID NO : 1580)	1.7
RAG3A-195	AAACTTCTGCTCCTGTCCC (SEQ ID NO : 697)	AAACUUCUGCUCUCCUCCCTT (SEQ ID NO : 1139)	GGGACAGGAGCAGAAGUUUTT (SEQ ID NO : 1581)	1.7
RAG3A-850	CAAGGTCAGGCCAGGAAGC (SEQ ID NO : 698)	CAAGGUCAGGCCAGGAAGCTT (SEQ ID NO : 1140)	GCUUCCUGGCCUGACC UUGTT (SEQ ID NO : 1582)	1.7
RAG3A-388	AGATAGGACTCCCTAGGG (SEQ ID NO : 699)	AGAUAGGACUCCCUAGGGGTT (SEQ ID NO : 1141)	CCCCUAGGGAGUCCUAUCUTT (SEQ ID NO : 1583)	1.7

RAG3A-1079	TTCCCTGGTCATGCCTGCC (SEQ ID NO : 700)	UUCCUGGUCAUGCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1142)	GGCAGGAUGACCAGGGAATT (SEQ ID NO : 1584)	1.7
RAG3A-1263	TACCCAGGACAGGGACCTA (SEQ ID NO : 701)	UACCCAGGACAGGGACCUATT (SEQ ID NO : 1143)	UAGGUCCUGUCCUGGGUATT (SEQ ID NO : 1585)	1.7
RAG3A-531	GCACGTGTGCGCACATACA (SEQ ID NO : 702)	GCACGUGUGCGCACAUACATT (SEQ ID NO : 1144)	UGUAUGUGCGCACACGUGCTT (SEQ ID NO : 1586)	1.7
RAG3A-254	AAGACCTCTGTGCTTCTTC (SEQ ID NO : 703)	AAGACCUCUGUGCUUCUUCTT (SEQ ID NO : 1145)	GAAGAAGCACAGAGGUUUUTT (SEQ ID NO : 1587)	1.7
RAG3A-421	ATCCGTGTTCCCACTTCGA (SEQ ID NO : 704)	AUCCGUGUCCCACUUCGATT (SEQ ID NO : 1146)	UCGAAGUGGGAACACGGAUTT (SEQ ID NO : 1588)	1.7
RAG3A-473	CCTTTCCCCATAACACCAA (SEQ ID NO : 705)	CCUUUCCCCAUAAACACCAATT (SEQ ID NO : 1147)	UUGGUGUUAUGGGGAAAGGTT (SEQ ID NO : 1589)	1.7
RAG3A-292	TGGATAGCCAGGGAGTGAA (SEQ ID NO : 706)	UGGAUAGCCAGGGAGUGAATT (SEQ ID NO : 1148)	UUCACUCCUGGCUAUCCATT (SEQ ID NO : 1590)	1.7
RAG3A-283	AGGAGTGAAACCCCAACC (SEQ ID NO : 707)	AGGGAGUGAAACCCCACTT (SEQ ID NO : 1149)	GGUGGGUUUUCACUCCCTT (SEQ ID NO : 1591)	1.7
RAG3A-786	AAAGGAGCTAGAGCCAGGG (SEQ ID NO : 708)	AAAGGAGCUAGAGCCAGGGTT (SEQ ID NO : 1150)	CCCUGGCUUAGCUCCUUUTT (SEQ ID NO : 1592)	1.7
RAG3A-582	TAAGCCACTGGACCCAGC (SEQ ID NO : 709)	UAAGCCACUGGACCCAGCTT (SEQ ID NO : 1151)	GCUGGGUCCAGUGGCUUATT (SEQ ID NO : 1593)	1.7
RAG3A-933	TTCTCAGCAGACATGCCCA (SEQ ID NO : 710)	UUCUCAGCAGACAUGCCCAT (SEQ ID NO : 1152)	UGGGCAUGUCUGCUGAGAATT (SEQ ID NO : 1594)	1.7
RAG3A-472	CTTTCCCCATAACACCAAC (SEQ ID NO : 711)	CUUCCCCAUAAACACCAACTT (SEQ ID NO : 1153)	GUUGGUGUUAUGGGGAAAGTT (SEQ ID NO : 1595)	1.7
RAG3A-646	GGAAGACGGAGACAGAACA (SEQ ID NO : 712)	GGAAGACGGAGACAGAACATT (SEQ ID NO : 1154)	UGUUCUGUCUCCGUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1596)	1.6
RAG3A-389	AAGATAGGACTCCCTAGGG (SEQ ID NO : 713)	AAGAUAGGACUCCCUAGGGTT (SEQ ID NO : 1155)	CCCUAGGGAGUCCUAUCUUTT (SEQ ID NO : 1597)	1.6
RAG3A-971	TCTGGCTGGACGGGAAAT (SEQ ID NO : 714)	UCUGGCUGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO : 1156)	AUUUCCCGUCCAGCCAGATT (SEQ ID NO : 1598)	1.6
RAG3A-751	GCCAGCAGGGAGGTATTG (SEQ ID NO : 715)	GCCAGCAGGGAGGUUUUUGTT (SEQ ID NO : 1157)	CAAAUACCUCCUGCUGGCTT (SEQ ID NO : 1599)	1.6

RAG3A-299	AGAAATTGGATAGCCAGG (SEQ ID NO : 716)	AGAAUUUGGAUAGCCAGGTT (SEQ ID NO : 1158)	CCUGGCUAUCCAAUUUCUTT (SEQ ID NO : 1600)	1.6
RAG3A-750	CCAGCAGGGAGGTATTGCG (SEQ ID NO : 717)	CCAGCAGGGAGGUUUUGCTT (SEQ ID NO : 1159)	GCAAAUACCUCCCUGCUGGTT (SEQ ID NO : 1601)	1.6
RAG3A-671	TGTCACATGTGGAACGGTA (SEQ ID NO : 718)	UGUCACAUGUGGAACGGUATT (SEQ ID NO : 1160)	UACCGUCCACAUGUGACATT (SEQ ID NO : 1602)	1.6
RAG3A-749	CAGCAGGGAGGTATTGCG (SEQ ID NO : 719)	CAGCAGGGAGGUUUUGCGTT (SEQ ID NO : 1161)	CGCAAAUACCUCCCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1603)	1.6
RAG3A-547	TCAGGCTTAACCCAGTGCA (SEQ ID NO : 720)	UCAGGCUUAACCCAGUGCATT (SEQ ID NO : 1162)	UGCACUGGGUUAAAGCCUGATT (SEQ ID NO : 1604)	1.6
RAG3A-655	GTAGGAGATGGAAGACGGA (SEQ ID NO : 721)	GUAGGAGAUGGAAGACGGATT (SEQ ID NO : 1163)	UCCGUCUCCAUCCUCCUACTT (SEQ ID NO : 1605)	1.6
RAG3A-170	GGTCCCAGGTTGCCCATGT (SEQ ID NO : 722)	GGUCCCAGGUUGCCCAUGUTT (SEQ ID NO : 1164)	ACAUGGGCAACCUGGGACCTT (SEQ ID NO : 1606)	1.6
RAG3A-629	CAAGCAAAGGAGGGCCCTG (SEQ ID NO : 723)	CAAGCAAAGGAGGGCCCUGTT (SEQ ID NO : 1165)	CAGGGCCCUCCUUUGCUUGTT (SEQ ID NO : 1607)	1.6
RAG3A-253	AGACCTCTGTGCTTCTTCC (SEQ ID NO : 724)	AGACCUUGUGCUUCUCCCTT (SEQ ID NO : 1166)	GGAAGAAAGCACAGAGGUCUTT (SEQ ID NO : 1608)	1.6
RAG3A-695	ACACATGGGCCTGGTTATT (SEQ ID NO : 725)	ACACAUGGGCCUGGUUAUUTT (SEQ ID NO : 1167)	AAUAAACCAGGCCCAUGUGUTT (SEQ ID NO : 1609)	1.6
RAG3A-788	GCAAAGGAGCTAGAGCCAG (SEQ ID NO : 726)	GCAAAGGAGCUAGAGCCAGTT (SEQ ID NO : 1168)	CUGGCUCUAGCUCCUUUGCTT (SEQ ID NO : 1610)	1.6
RAG3A-688	GGCCTGGTTATTCCTCTTG (SEQ ID NO : 727)	GGCCUGGUUAUCCUCUUGTT (SEQ ID NO : 1169)	CAAGAGGAUAACCAAGGCCTT (SEQ ID NO : 1611)	1.6
RAG3A-728	GGAGGTCCAGCAGCTGTCT (SEQ ID NO : 728)	GGAGGUCCAGCAGCUGUCUTT (SEQ ID NO : 1170)	AGACAGCUGCUGGACCUCCTT (SEQ ID NO : 1612)	1.6
RAG3A-519	ACATACATGTGCCCCGCAC (SEQ ID NO : 729)	ACAUACAUGUGCCCCGCACCTT (SEQ ID NO : 1171)	GUGCGGGGCACAUGUAUGUTT (SEQ ID NO : 1613)	1.6
RAG3A-272	ACCCACCAATCTTAAACA (SEQ ID NO : 730)	ACCCACCAAUUCUUAACATT (SEQ ID NO : 1172)	UGUUUAAGAUAUGGUGGGGUTT (SEQ ID NO : 1614)	1.6
RAG3A-318	GGTATGATGTCCAGGGAAA (SEQ ID NO : 731)	GGUAUGAUGUCCAGGGAAATT (SEQ ID NO : 1173)	UUUCCUGGACAUCAUACCTT (SEQ ID NO : 1615)	1.6

RAG3A-1338	AAACCCCTCACCCTCTC (SEQ ID NO : 732)	AAACCCUCACCCUCUCTT (SEQ ID NO : 1174)	GAGAGGGUGGUGAGGGUUUTT (SEQ ID NO : 1616)	1.6
RAG3A-539	AACCCAGTGACGTGTGCG (SEQ ID NO : 733)	AACCCAGUGCACGUGGCGTT (SEQ ID NO : 1175)	CGCACACGUGCACUGGGUUTT (SEQ ID NO : 1617)	1.6
RAG3A-826	AGGACAGAGACTGTGGGA (SEQ ID NO : 734)	AGGACAGAGACUGUGGGGATT (SEQ ID NO : 1176)	UCCCCACAGUCUCUGUCCUTT (SEQ ID NO : 1618)	1.6
RAG3A-337	CTGTTGGATTTCAGCAGCA (SEQ ID NO : 735)	CUGUUGGAUUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO : 1177)	UGCUGCUGAAAUCCAACAGTT (SEQ ID NO : 1619)	1.6
RAG3A-273	AACCCACCAATCTTAAAC (SEQ ID NO : 736)	AACCCACCAUUCUAAAATT (SEQ ID NO : 1178)	GUUUAAGAUUGGUGGGUUTT (SEQ ID NO : 1620)	1.6
RAG3A-478	CAAACCCCTTCCCCATAAC (SEQ ID NO : 737)	CAAACCCUUUCCCCAUAACTT (SEQ ID NO : 1179)	GUUAUGGGGAAAGGGUUUUTT (SEQ ID NO : 1621)	1.6
RAG3A-963	GACGGGAAAATTCCAGGAT (SEQ ID NO : 738)	GACGGGAAAUUCACAGGAUTT (SEQ ID NO : 1180)	AUCCUGGAAUUUCCCGUCTT (SEQ ID NO : 1622)	1.6
RAG3A-248	TCTGTGCTTCTTCCCCAGC (SEQ ID NO : 739)	UCUGUGCUUUCUCCCCAGCTT (SEQ ID NO : 1181)	GCUGGGGAAGAAGCACAGATT (SEQ ID NO : 1623)	1.6
RAG3A-35	TCACCAGTGTCTGGTGGCT (SEQ ID NO : 740)	UCACCAGUGUCUGGUGGCUTT (SEQ ID NO : 1182)	AGCCACCAGACACUGGUGATT (SEQ ID NO : 1624)	1.5
RAG3A-613	CTGGGCACAGAGGTCTGTG (SEQ ID NO : 741)	CUGGGCACAGAGGUCUGUGTT (SEQ ID NO : 1183)	CACAGACCUCUGUGCCCAGTT (SEQ ID NO : 1625)	1.5
RAG3A-1141	CCCTTCCTTCACCCAAAGG (SEQ ID NO : 742)	CCCUUCCUUCACCCAAAGGTT (SEQ ID NO : 1184)	CCCUUGGGUGAAGGAAGGTT (SEQ ID NO : 1626)	1.5
RAG3A-477	AAACCCCTTCCCCATAACA (SEQ ID NO : 743)	AAACCCUUUCCCCAUAACTT (SEQ ID NO : 1185)	UGUUAUGGGGAAGGGUUUTT (SEQ ID NO : 1627)	1.5
RAG3A-634	CAGAACAAAGCAAAGGAGGG (SEQ ID NO : 744)	CAGAACAAAGCAAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1186)	CCCUCCUUUGCUUGUUCUGTT (SEQ ID NO : 1628)	1.5
RAG3A-1280	GCTCCTCATCTTGTGTTA (SEQ ID NO : 745)	GCUCCUCAUUCUUGUGUUATT (SEQ ID NO : 1187)	UAACACAAGAAUGAGGAGCTT (SEQ ID NO : 1629)	1.5
RAG3A-1062	CCTCCCTGTCTCCTGTCTC (SEQ ID NO : 746)	CCUCCUGUCUCCUGUCUCTT (SEQ ID NO : 1188)	GAGACAGGAGACAGGGAGGTT (SEQ ID NO : 1630)	1.5
RAG3A-778	TAGAGCCAGGGCCAAAGGA (SEQ ID NO : 747)	UAGAGCCAGGGCCAAAGGATT (SEQ ID NO : 1189)	UCCUUUGGCCUUGGCUCUATT (SEQ ID NO : 1631)	1.5

RAG3A-939	CCACACTTCTCAGCAGACA (SEQ ID NO : 748)	CCACACUUCUCAGCAGACATT (SEQ ID NO : 1190)	UGUCUGCUGAGAAUGUGGTT (SEQ ID NO : 1632)	1.5
RAG3A-779	CTAGAGCCAGGGCCAAAGG (SEQ ID NO : 749)	CUAGAGCCAGGGCCAAAGGTT (SEQ ID NO : 1191)	CCUUUGGCCCUUGGCUCUAGTT (SEQ ID NO : 1633)	1.5
RAG3A-803	GGGACTGGGAAGAAAGCAA (SEQ ID NO : 750)	GGGACUGGGAAGAAAGCAATT (SEQ ID NO : 1192)	UUGCUUUCUCCCCAGUCCCTT (SEQ ID NO : 1634)	1.5
RAG3A-1382	GTCCATCAGCCGATCTCCC (SEQ ID NO : 751)	GUCCAUCAGCCGAUCUCCCTT (SEQ ID NO : 1193)	GGGAGAUCCGUGAUGGACTT (SEQ ID NO : 1635)	1.5
RAG3A-97	AGGAGTGGACCCCTGGTCCA (SEQ ID NO : 752)	AGGAGUGGACCCUGGUCCATT (SEQ ID NO : 1194)	UGGACCAGGGUCCACUCCUTT (SEQ ID NO : 1636)	1.5
RAG3A-543	GCTTAACCCAGTGCACGTG (SEQ ID NO : 753)	GCUUAACCCAGUGCACGUGTT (SEQ ID NO : 1195)	CACGUGCACUGGGUUAAGCTT (SEQ ID NO : 1637)	1.5
RAG3A-556	CACCTAAGCTCAGGCTTAA (SEQ ID NO : 754)	CACCUAAGCUCAGGCUUAATT (SEQ ID NO : 1196)	UUAAGCCUGAGCUUAGGUGTT (SEQ ID NO : 1638)	1.5
RAG3A-60	GAGAAAGGCTCACTTCCGG (SEQ ID NO : 755)	GAGAAAGCGUCACUUCGCGTT (SEQ ID NO : 1197)	CCGGAAGUGACGCCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1639)	1.5
RAG3A-647	TGGAAGACGGAGACAGAAC (SEQ ID NO : 756)	UGGAAGACGGAGACAGAACTT (SEQ ID NO : 1198)	GUUCUGUCUCCGUCUCCATT (SEQ ID NO : 1640)	1.5
RAG3A-243	GCTTCTTCCCCAGCAACAC (SEQ ID NO : 757)	GCUUCUCCCCAGCAACACTT (SEQ ID NO : 1199)	GUGUUGCUGGGGAAGAAGCTT (SEQ ID NO : 1641)	1.5
RAG3A-533	GTGCACGTGTGCGCACATA (SEQ ID NO : 758)	GUGCACGUGUGCGCACAUATT (SEQ ID NO : 1200)	UAUGUGCGCACACGUGCACTT (SEQ ID NO : 1642)	1.5
RAG3A-628	AAGCAAAGGAGGGCCCTGG (SEQ ID NO : 759)	AAGCAAAGGAGGGCCCCUGGTT (SEQ ID NO : 1201)	CCAGGGCCCUCCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1643)	1.5
RAG3A-849	AAGGTCAGGCCAGGAAGCC (SEQ ID NO : 760)	AAGGUCAGGCCAGGAAGCCTT (SEQ ID NO : 1202)	GGCUUCCUGGCCUGACCUUTT (SEQ ID NO : 1644)	1.5
RAG3A-1307	CTGCCCTCCCTACCTTCTCT (SEQ ID NO : 761)	CUGCCUCCCUACCUUCUCUTT (SEQ ID NO : 1203)	AGAGAAAGGUAGGGAGGCAGTT (SEQ ID NO : 1645)	1.5
RAG3A-293	TTGGATAGCCAGGGAGTGA (SEQ ID NO : 762)	UUGGAUAGCCAGGGAGUGATT (SEQ ID NO : 1204)	UCACUCCCUGGCUAUCCAATT (SEQ ID NO : 1646)	1.5
RAG3A-1285	AGGTCGCTCCTCATTTCTTG (SEQ ID NO : 763)	AGGUCGCUCCUCAUUCUUGTT (SEQ ID NO : 1205)	CAAGAAUGAGGAGCGACCUTT (SEQ ID NO : 1647)	1.5

RAG3A-1223	CCCTTCTGTGGAGTGACAG (SEQ ID NO : 764)	CCCUUCUGUGGAGUGACAGTT (SEQ ID NO : 1206)	CUGUCACUCCACAGAGGGTT (SEQ ID NO : 1648)	1.5
RAG3A-1177	CAGGCGCATTCGACAGTCC (SEQ ID NO : 765)	CAGGCGCAUUCGACAGUCCTT (SEQ ID NO : 1207)	GGACUGUGAAUGCGCCUGTT (SEQ ID NO : 1649)	1.5
RAG3A-226	ACAAATGTCCTGCCAGATT (SEQ ID NO : 766)	ACAAUGUCCUGCCAGAUUTT (SEQ ID NO : 1208)	AAUCUGGCAGGACAUUUGUTT (SEQ ID NO : 1650)	1.5
RAG3A-1097	CAGCCTCCTTTCTCTTGGT (SEQ ID NO : 767)	CAGCCUCCUUUCUUGGUTT (SEQ ID NO : 1209)	ACCAAGAGAAAGGAGCUGTT (SEQ ID NO : 1651)	1.5
RAG3A-1188	TAACTTATCCTCAGGCGCA (SEQ ID NO : 768)	UAACUUAUCCUCAGGCGCATT (SEQ ID NO : 1210)	UGCGCCUGAGGAUAAGUUATT (SEQ ID NO : 1652)	1.5
RAG3A-593	GTGTAGCCATCTAAGCCAC (SEQ ID NO : 769)	GUGUAGCCAUCUAAAGCCACTT (SEQ ID NO : 1211)	GUGGCUUAGAUGGCUACACTT (SEQ ID NO : 1653)	1.5
RAG3A-670	GTCACATGTGGAACGGTAG (SEQ ID NO : 770)	GUCACAUGUGGAACGGUAGTT (SEQ ID NO : 1212)	CUACCGUCCACAUGUGACTT (SEQ ID NO : 1654)	1.5
RAG3A-503	CACCTGACAGTCCACTCAA (SEQ ID NO : 771)	CACCUGACAGUCCACUCAATT (SEQ ID NO : 1213)	UUGAGUGGACUGUCAGGUGTT (SEQ ID NO : 1655)	1.5
RAG3A-1167	CGACAGTCCCCTCTTGCTT (SEQ ID NO : 772)	CGACAGUCCCUUCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1214)	AAGCAAGAGGGGACUGUCGTT (SEQ ID NO : 1656)	1.5
RAG3A-583	CTAAGCCACTGGACCCAG (SEQ ID NO : 773)	CUAAGCCACUGGACCCCAGTT (SEQ ID NO : 1215)	CUGGGGUCCAGUGGCUUAGTT (SEQ ID NO : 1657)	1.5
RAG3A-706	CTAAGACAGGGACACATGG (SEQ ID NO : 774)	CUAAGACAGGGACACAUGGTT (SEQ ID NO : 1216)	CCAUGUGUCCCUGUCUAGTT (SEQ ID NO : 1658)	1.5
RAG3A-983	GGAGACATCTCGTCTGGCT (SEQ ID NO : 775)	GGAGACAUCUCUGUCGUCUTT (SEQ ID NO : 1217)	AGCCAGACGAGAUGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1659)	1.5
RAG3A-718	CAGCTGTCTTTCCTAAGAC (SEQ ID NO : 776)	CAGCUGUCUUUCCUAAGACTT (SEQ ID NO : 1218)	GUCUUAAGGAAAGACAGCUGTT (SEQ ID NO : 1660)	1.5
RAG3A-378	CCCTAGGGGATTACAGAAA (SEQ ID NO : 777)	CCCUAGGGGAUUACAGAAATT (SEQ ID NO : 1219)	UUUCUGUAAUCCCUAGGTT (SEQ ID NO : 1661)	1.5
RAG3A-1095	GCCTCCTTTCTCTTGGTTC (SEQ ID NO : 778)	GCCUCCUUUCUUGGUUCTT (SEQ ID NO : 1220)	GAACCAAGAGAAAGGAGGCTT (SEQ ID NO : 1662)	1.4
RAG3A-698	GGGACACATGGGCCTGGTT (SEQ ID NO : 779)	GGGACACAUGGGCCUGGUUTT (SEQ ID NO : 1221)	AACCAAGGCCC AUGUGUCCCTT (SEQ ID NO : 1663)	1.4

RAG3A-277	TGAAAACCCACCAATCTT (SEQ ID NO : 780)	UGAAAACCCACCAUCUUTT (SEQ ID NO : 1222)	AAGAUUGGUGGGUUUUCATT (SEQ ID NO : 1664)	1.4
RAG3A-644	AAGACGGAGACAGAACAAAG (SEQ ID NO : 781)	AAGACGGAGACAGAACAAAGTT (SEQ ID NO : 1223)	CUUGUUCUGUCUCCGUCUUTT (SEQ ID NO : 1665)	1.4
RAG3A-941	GGCCACACTTCTCAGCAGA (SEQ ID NO : 782)	GGCCACACUUCUCAGCAGATT (SEQ ID NO : 1224)	UCUGCUGAGAGUGUGGCCTT (SEQ ID NO : 1666)	1.4
RAG3A-794	AAGAAAGCAAAGGAGCTAG (SEQ ID NO : 783)	AAGAAAGCAAAGGAGCUAGTT (SEQ ID NO : 1225)	CUAGCUCCUUUGCUUUUCUUTT (SEQ ID NO : 1667)	1.4
RAG3A-890	GAGCCTGAGGAAGTTCTGG (SEQ ID NO : 784)	GAGCCUGAGGAAGUUCUGGTT (SEQ ID NO : 1226)	CCAGAACUUCUCAGGCUCTT (SEQ ID NO : 1668)	1.4
RAG3A-1310	AGCCTGCCCTCCCTACCTTC (SEQ ID NO : 785)	AGCCUGCCUCCCUACCUUCTT (SEQ ID NO : 1227)	GAAGGUAGGGAGGCAGGCUTT (SEQ ID NO : 1669)	1.4
RAG3A-27	GTCTGGTGGCTCCCTTCTC (SEQ ID NO : 786)	GUCUGGUGGCUCUCCUUCUCTT (SEQ ID NO : 1228)	GAGAAGGAGCCACCAGACTT (SEQ ID NO : 1670)	1.4
RAG3A-38	CCTTCACCAGTGTCTGGTG (SEQ ID NO : 787)	CCUUCACCAGUGUCUGGUGTT (SEQ ID NO : 1229)	CACCAGACACUGGUGAAGGTT (SEQ ID NO : 1671)	1.4
RAG3A-532	TGCACGTGTGCGCACATAC (SEQ ID NO : 788)	UGCACGUGUGCGCACAUACTT (SEQ ID NO : 1230)	GU AUGUGCGCACACGUGCATT (SEQ ID NO : 1672)	1.4
RAG3A-1023	TATCCTCCCAGCTATCCCA (SEQ ID NO : 789)	UAUCCUCCAGCUAUCCCATTT (SEQ ID NO : 1231)	UGGGAUAGCUGGGAGGAUATT (SEQ ID NO : 1673)	1.4
RAG3A-797	GGGAAGAAAGCAAAGGAGC (SEQ ID NO : 790)	GGGAAGAAAGCAAAGGAGCTT (SEQ ID NO : 1232)	GCUCCUUUGCUUUUCCCTT (SEQ ID NO : 1674)	1.4
RAG3A-399	GGGGAATGACAAAGATAGGA (SEQ ID NO : 791)	GGGGAUAGACAAGAUAGGATT (SEQ ID NO : 1233)	UCCUAUCUUGUCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1675)	1.4
RAG3A-945	TCTAGGCCACACTTCTCAG (SEQ ID NO : 792)	UCUAGGCCACACUUCUCAGTT (SEQ ID NO : 1234)	CUGAGAAGUGUGGCCUAGATT (SEQ ID NO : 1676)	1.4
RAG3A-344	AAGCATCCTGTTGGATTTC (SEQ ID NO : 793)	AAGCAUCCUGUUGGAUUUCTT (SEQ ID NO : 1235)	GAAAUCCAACAGGAUGCUUTT (SEQ ID NO : 1677)	1.4
RAG3A-1255	ACAGGGACCTAGCCAGAAA (SEQ ID NO : 794)	ACAGGGACCUAGCCAGAAATT (SEQ ID NO : 1236)	UUUCUGGCUAGGUCCCCGUTT (SEQ ID NO : 1678)	1.4
RAG3A-524	TGCGCACATACATGTGCC (SEQ ID NO : 795)	UGCGCACAUACAUGUGCCCTT (SEQ ID NO : 1237)	GGGCACAUGUAUGUGCGCATT (SEQ ID NO : 1679)	1.4

RAG3A-244	TGCTTCTTCCCCAGCAACA (SEQ ID NO : 796)	UGCUCUCCCCAGCAACATT (SEQ ID NO : 1238)	UGUUGCUGGGAAGAAGCATT (SEQ ID NO : 1680)	1.4
RAG3A-340	ATCCTGTGTTGGATTTCAGCA (SEQ ID NO : 797)	AUCCUGUUGGAUUUCAGCATT (SEQ ID NO : 1239)	UGCUGAAAUCCAACAGGAUTT (SEQ ID NO : 1681)	1.4
RAG3A-687	GCCTGGTTATTCTCTTGT (SEQ ID NO : 798)	GCCUGGUUAUCCUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1240)	ACAAGAGGAUAACACGCGTT (SEQ ID NO : 1682)	1.4
RAG3A-568	CCAGCAGACGAGCACCTAA (SEQ ID NO : 799)	CCAGCAGACGAGCACCUAATT (SEQ ID NO : 1241)	UUAGGUGCUCGUCUCUGGTT (SEQ ID NO : 1683)	1.4
RAG3A-804	TGGGACTGGGAAGAAAGCA (SEQ ID NO : 800)	UGGGACUGGGAAGAAAGCATT (SEQ ID NO : 1242)	UGCUCUCCAGUCCCATTT (SEQ ID NO : 1684)	1.4
RAG3A-496	CAGTCCACTCAACCCGTCC (SEQ ID NO : 801)	CAGUCCACUCAACCCGUCCTT (SEQ ID NO : 1243)	GGACGGGUUGAGUGGACUGTT (SEQ ID NO : 1685)	1.4
RAG3A-810	GGAGACTGGGACTGGGAAG (SEQ ID NO : 802)	GGAGACUGGGACUGGGAAGTT (SEQ ID NO : 1244)	CUUCCAGUCCAGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1686)	1.4
RAG3A-356	AAGCAGGAAGCAAGCATC (SEQ ID NO : 803)	AAGCAGGAAGCAAGCAUCTT (SEQ ID NO : 1245)	GAUGCUCUUCUCCUGCUUTT (SEQ ID NO : 1687)	1.4
RAG3A-1248	CCTAGCCAGAAACCGGCAG (SEQ ID NO : 804)	CCUAGCCAGAAACCGGCAGTT (SEQ ID NO : 1246)	CUGCCGGUUUCUGGCUAGGTT (SEQ ID NO : 1688)	1.4
RAG3A-1015	CAGCTATCCCAGCACCCCTC (SEQ ID NO : 805)	CAGCUAUCCAGCACCCUCTT (SEQ ID NO : 1247)	GAGGUGCUGGGAUAGCUGTT (SEQ ID NO : 1689)	1.4
RAG3A-645	GAGACGGAGACAGAACAA (SEQ ID NO : 806)	GAAGACGGAGACAGAACAATT (SEQ ID NO : 1248)	UUGUUCUGUCUCCGUCUUCTT (SEQ ID NO : 1690)	1.4
RAG3A-517	ATACATGTGCCCCGCACCT (SEQ ID NO : 807)	AUACAUGUGCCCCGCACCUUTT (SEQ ID NO : 1249)	AGGUGCGGGGCACAUGUAUTT (SEQ ID NO : 1691)	1.4
RAG3A-194	AACTTCTGCTCCTGTCCCC (SEQ ID NO : 808)	AACUUCUGCUCUCCUCCCCCTT (SEQ ID NO : 1250)	GGGACAGGAGCAGAAGUUTT (SEQ ID NO : 1692)	1.4
RAG3A-927	GCAGACATGCCCATCCTTG (SEQ ID NO : 809)	GCAGACAUGCCCAUCCUUGTT (SEQ ID NO : 1251)	CAAGGAUGGGCAUGUCUGCTT (SEQ ID NO : 1693)	1.4
RAG3A-271	CCCACCAATCTTAAACAA (SEQ ID NO : 810)	CCCACCAAUUUAAACAATT (SEQ ID NO : 1252)	UUGUUUAAGAUAUGGUGGGTT (SEQ ID NO : 1694)	1.4
RAG3A-398	GGGAATGACAAGATAGGAC (SEQ ID NO : 811)	GGGAUAGACAAGAUAGGACTT (SEQ ID NO : 1253)	GUCCUAUCUUGUCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1695)	1.4

RAG3A-230	CAACACAAATGTCCTGCCA (SEQ ID NO : 812)	CAACACAAUGUCCUGCCATT (SEQ ID NO : 1254)	UGGCAGGACAUUUGUGUUGTT (SEQ ID NO : 1696)	1.4
RAG3A-1104	CCACTCCCAGCCTCCTTTC (SEQ ID NO : 813)	CCACUCCAGCCUCUUCUUCTT (SEQ ID NO : 1255)	GAAAGGAGGCUUGGGAGUGGTT (SEQ ID NO : 1697)	1.4
RAG3A-1254	CAGGGACCTAGCCAGAAAC (SEQ ID NO : 814)	CAGGACCUAGCCAGAAACTT (SEQ ID NO : 1256)	GUUUCUGGCUAGGUCCCUGTT (SEQ ID NO : 1698)	1.4
RAG3A-288	TAGCCAGGGAGTGAAAACC (SEQ ID NO : 815)	UAGCCAGGGAGUGAAAACCTT (SEQ ID NO : 1257)	GGUUUUCACUCCCGGCUATT (SEQ ID NO : 1699)	1.4
RAG3A-837	GGAAGCCCCTGAGGACAGA (SEQ ID NO : 816)	GGAAGCCCCUGAGGACAGATT (SEQ ID NO : 1258)	UCUGUCCUCAGGGGCUUCCTT (SEQ ID NO : 1700)	1.4
RAG3A-935	ACTTCTCAGCAGACATGCC (SEQ ID NO : 817)	ACUUCUCAGCAGACAUGCCTT (SEQ ID NO : 1259)	GGCAUGUCUCUGAGAAGUTT (SEQ ID NO : 1701)	1.4
RAG3A-476	AACCCCTTTCCCCATAACAC (SEQ ID NO : 818)	AACCCUUUCCCCAUAAACACTT (SEQ ID NO : 1260)	GUGUUAUGGGGAAAGGGUUTT (SEQ ID NO : 1702)	1.4
RAG3A-589	AGCCATCTAAGCCACTGGA (SEQ ID NO : 819)	AGCCAUCUAAGCCACUGGATT (SEQ ID NO : 1261)	UCCAGUGGCUUAGAUGGCUTT (SEQ ID NO : 1703)	1.4
RAG3A-1207	CAGTATCTCCCTCTCATTTG (SEQ ID NO : 820)	CAGUAUCUCCUCUCAUUGTT (SEQ ID NO : 1262)	CA AUGAGAGGGAGAUACUGTT (SEQ ID NO : 1704)	1.4
RAG3A-1284	GGTCGCTCCTCATTTCTTGT (SEQ ID NO : 821)	GGUCGCUCCUCAUUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1263)	ACAAGAAUGAGGAGCGACCTT (SEQ ID NO : 1705)	1.4
RAG3A-956	AAATTCCAGGATCTAGGCC (SEQ ID NO : 822)	AAAUUCCAGGAUCUAGGCCTT (SEQ ID NO : 1264)	GGCCUAGAUCUCCUGGAAUUUTT (SEQ ID NO : 1706)	1.4
RAG3A-557	GCACCTAAGCTCAGGCTTA (SEQ ID NO : 823)	GCACCUAAGCUCAGGCUUATT (SEQ ID NO : 1265)	UAAGCCUGAGCUUAGGUGCTT (SEQ ID NO : 1707)	1.4
RAG3A-500	CTGACAGTCCACTCAACCC (SEQ ID NO : 824)	CUGACAGUCCACUCAACCCTT (SEQ ID NO : 1266)	GGGUUGAGUGGACUGUCAGTT (SEQ ID NO : 1708)	1.4
RAG3A-1208	ACAGTATCTCCCTCTCATTT (SEQ ID NO : 825)	ACAGUAUCUCCUCUCAUUTT (SEQ ID NO : 1267)	AAUGAGAGGGAGAUACUGUTT (SEQ ID NO : 1709)	1.4
RAG3A-686	CCTGGTTATTCTCTCTTGTC (SEQ ID NO : 826)	CCUGGUUAUUCUUCUUGUCTT (SEQ ID NO : 1268)	GACAAGAGGAAUAACCAGGTT (SEQ ID NO : 1710)	1.4
RAG3A-1168	TCGACAGTCCCCTCTTGCT (SEQ ID NO : 827)	UCGACAGUCCCCUCUUGCUTT (SEQ ID NO : 1269)	AGCAAGAGGGGACUGUCGATT (SEQ ID NO : 1711)	1.4

RAG3A-218	CCTGCCAGATTCTCTCTGG (SEQ ID NO : 828)	CCUGCCAGAUUCCUCCUGGTT (SEQ ID NO : 1270)	CCAGGAGGAUCUGGCAGGTT (SEQ ID NO : 1712)	1.4
RAG3A-835	AAGCCCCCTGAGGACAGAGA (SEQ ID NO : 829)	AAGCCCCUGAGGACAGAGATT (SEQ ID NO : 1271)	UCUCUGUCCUCAGGGGUUUTT (SEQ ID NO : 1713)	1.4
RAG3A-291	GGATAGCCAGGGAGTGAAA (SEQ ID NO : 830)	GGAUAGCCAGGGAGUGAAATT (SEQ ID NO : 1272)	UUUCACUCCUCUGGCUAUCCTT (SEQ ID NO : 1714)	1.3
RAG3A-1222	CCTTCTGTGGAGTGACAGT (SEQ ID NO : 831)	CCUUCUGUGGAGUGACAGUTT (SEQ ID NO : 1273)	ACUGUCACUCCACAGAAAGTT (SEQ ID NO : 1715)	1.3
RAG3A-276	GAAACCCCAATCTTA (SEQ ID NO : 832)	GAAACCCCAACCAUCUATT (SEQ ID NO : 1274)	UAAGAUUGGUGGGGUUUUUTT (SEQ ID NO : 1716)	1.3
RAG3A-156	CATGTCCAGGAAAAGATGG (SEQ ID NO : 833)	CAUGUCCAGGAAAAGAUGTT (SEQ ID NO : 1275)	CCAUCUUUCCUGGACAUGTT (SEQ ID NO : 1717)	1.3
RAG3A-937	ACACTTCTCAGCAGACATG (SEQ ID NO : 834)	ACACUUCUCAGCAGACAUGTT (SEQ ID NO : 1276)	CAUGUCUGCUGAGAAGUGUTT (SEQ ID NO : 1718)	1.3
RAG3A-1262	ACCCAGGACAGGGACCCTAG (SEQ ID NO : 835)	ACCCAGGACAGGGACCUAGTT (SEQ ID NO : 1277)	CUAGGUCCUCUGCCUGGGUTT (SEQ ID NO : 1719)	1.3
RAG3A-1139	CTTCCTTCACCCAAAGGAC (SEQ ID NO : 836)	CUUCCUUCACCCAAAGGACTT (SEQ ID NO : 1278)	GUCCCUUGGGUGAAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1720)	1.3
RAG3A-535	CAGTGCACGTGTGCGACA (SEQ ID NO : 837)	CAGUGCACGUGUGCGCACATT (SEQ ID NO : 1279)	UGUGCGCACACGUGCACUGTT (SEQ ID NO : 1721)	1.3
RAG3A-719	GCAGCTGTCTTTCCTAAGA (SEQ ID NO : 838)	GCAGCUGUCUUUCCUAAAGATT (SEQ ID NO : 1280)	UCUUAAGGAAAGACAGCUGCTT (SEQ ID NO : 1722)	1.3
RAG3A-726	AGGTCCAGCAGCTGTCTTT (SEQ ID NO : 839)	AGGUCCAGCAGCUGUCUUUTT (SEQ ID NO : 1281)	AAAGACAGCUGCUGGACCUTT (SEQ ID NO : 1723)	1.3
RAG3A-384	AGGACTCCCTAGGGGATTA (SEQ ID NO : 840)	AGGACUCCCUAGGGGAUATT (SEQ ID NO : 1282)	UAAUCCCCUAGGGAGUCCUTT (SEQ ID NO : 1724)	1.3
RAG3A-834	AGCCCCTGAGGACAGAGAC (SEQ ID NO : 841)	AGCCCCUGAGGACAGAGACTT (SEQ ID NO : 1283)	GUCUCUGUCCUCAGGGGCUUTT (SEQ ID NO : 1725)	1.3
RAG3A-562	GACGAGCACCTAAGCTCAG (SEQ ID NO : 842)	GACGAGCACCUAAGCUCAGTT (SEQ ID NO : 1284)	CUGAGCUUAGGUGCUCGUCTT (SEQ ID NO : 1726)	1.3
RAG3A-940	GCCACACTTCTCAGCAGAC (SEQ ID NO : 843)	GCCACACUUCUCAGCAGACTT (SEQ ID NO : 1285)	GUCUGCUGAGAAGUGUGGCTT (SEQ ID NO : 1727)	1.3

RAG3A-632	GAACAAGCAAAGGAGGGCC (SEQ ID NO : 844)	GAACAAGCAAAGGAGGCCTT (SEQ ID NO : 1286)	GGCCCUUUUGCUUUCUCTT (SEQ ID NO : 1728)	1.3
RAG3A-746	CAGGAGGTATTGCGGG (SEQ ID NO : 845)	CAGGAGGUUUUGCGGGGTT (SEQ ID NO : 1287)	CCCCGAAAUACCUCCUGTT (SEQ ID NO : 1729)	1.3
RAG3A-1309	GCCTGCCCTCCCTACCTTCT (SEQ ID NO : 846)	GCCUGCCUCCUACCUUCUTT (SEQ ID NO : 1288)	AGAAGUAGGAGGCAGGCTT (SEQ ID NO : 1730)	1.3
RAG3A-780	GCTAGAGCCAGGCCAAAG (SEQ ID NO : 847)	GCUAGAGCCAGGCCAAAGTT (SEQ ID NO : 1289)	CUUUGGCCCUGGCUUAGCTT (SEQ ID NO : 1731)	1.3
RAG3A-693	ACATGGGCCTGGTTATTCC (SEQ ID NO : 848)	ACAUGGGCCUGGUUAUUCCTT (SEQ ID NO : 1290)	GGAAUAACCAAGGCCCAUGTT (SEQ ID NO : 1732)	1.3
RAG3A-636	GACAGAACAAAGCAAGGAG (SEQ ID NO : 849)	GACAGAACAAAGCAAGGAGTT (SEQ ID NO : 1291)	CUCUUUGCUUUGUUCUGUCTT (SEQ ID NO : 1733)	1.3
RAG3A-258	AACAAGACCTCTGTGCTT (SEQ ID NO : 850)	AAACAAGACCUCUGUGCUUTT (SEQ ID NO : 1292)	AAGCACAGAGGUCUUGUUUTT (SEQ ID NO : 1734)	1.3
RAG3A-1022	ATCCTCCCAGCTATCCCAG (SEQ ID NO : 851)	AUCCUCCAGCUAUCCCAGTT (SEQ ID NO : 1293)	CUGGAUAGCUGGGAGGAUTT (SEQ ID NO : 1735)	1.3
RAG3A-381	ACTCCCTAGGGGATTACAG (SEQ ID NO : 852)	ACUCCCUAGGGGAUACAGTT (SEQ ID NO : 1294)	CUGUAUCCCCUAGGGAGUTT (SEQ ID NO : 1736)	1.3
RAG3A-379	TCCCTAGGGGATTACAGAA (SEQ ID NO : 853)	UCCCUAGGGGAUACAGAATT (SEQ ID NO : 1295)	UUCUGUAUCCCCUAGGGATT (SEQ ID NO : 1737)	1.3
RAG3A-663	GTGGAACGGTAGGAGATGG (SEQ ID NO : 854)	GUGGAACGGUAGGAGAUGTT (SEQ ID NO : 1296)	CCAUCUCCUACCGUUCCTT (SEQ ID NO : 1738)	1.3
RAG3A-1099	CCAGCCTCCTTCTCTTG (SEQ ID NO : 855)	CCCAGCCUCCUUCUCUUGTT (SEQ ID NO : 1297)	CAAGAGAAAGGAGGCUGGGTT (SEQ ID NO : 1739)	1.3
RAG3A-855	GGATCAAGGTCAGGCCAG (SEQ ID NO : 856)	GGGAUCAAGGUCAGGCCAGTT (SEQ ID NO : 1298)	CUGGCCUGACCUUGAUCCCTT (SEQ ID NO : 1740)	1.3
RAG3A-1279	CTCCTCATTTCTGTGTAC (SEQ ID NO : 857)	CUCCUCAUUCUUGUGUUAATT (SEQ ID NO : 1299)	GUACACAAGAAUGAGGAGTT (SEQ ID NO : 1741)	1.3
RAG3A-34	CACCAGTGTCTGGTGGTC (SEQ ID NO : 858)	CACCAGUGUCUGGUGGCUCTT (SEQ ID NO : 1300)	GAGCCACCAGACACUGGUGTT (SEQ ID NO : 1742)	1.3
RAG3A-633	AGAACAAAGCAAAGGAGGC (SEQ ID NO : 859)	AGAACAAAGCAAAGGAGGCTT (SEQ ID NO : 1301)	GCCCUCCUUUGCUUUCUUTT (SEQ ID NO : 1743)	1.3

RAG3A-453	CCATAACAGGAGATTCTC (SEQ ID NO : 860)	CCAUACAGGAGAUUUCUTT (SEQ ID NO : 1302)	GAGAAUCCUGUUAUGGTT (SEQ ID NO : 1744)	1.3
RAG3A-246	TGTGCTTCTTCCCCAGCAA (SEQ ID NO : 861)	UGUGCUUCUCCCCAGCAATT (SEQ ID NO : 1303)	UUGCUGGGGAAGAAGCACATT (SEQ ID NO : 1745)	1.3
RAG3A-592	TGTAGCCATCTAAGCCACT (SEQ ID NO : 862)	UGUAGCCAUUAAGCCACUTT (SEQ ID NO : 1304)	AGUGGCUUAGAUGGCUACATT (SEQ ID NO : 1746)	1.3
RAG3A-270	CCCACCAATCTTAAACAAG (SEQ ID NO : 863)	CCCACCAUUCUUAACAAGTT (SEQ ID NO : 1305)	CUUGUUUAAGAUUGGUGGGTT (SEQ ID NO : 1747)	1.3
RAG3A-630	ACAAGCAAAGGAGGCCCT (SEQ ID NO : 864)	ACAAGCAAAGGAGGCCCUTT (SEQ ID NO : 1306)	AGGGCCCUCCUUUGCUUGUTT (SEQ ID NO : 1748)	1.3
RAG3A-685	CTGGTTATTCCCTCTTGTC (SEQ ID NO : 865)	CUGGUUAUCCUCUUGUCATT (SEQ ID NO : 1307)	UGACAAGAGGAUAACCAGTT (SEQ ID NO : 1749)	1.3
RAG3A-1103	CAC TCCCAGCCTCCTTTCT (SEQ ID NO : 866)	CACUCCAGCCUCCUUUCUTT (SEQ ID NO : 1308)	AGAAAGGAGGCUGGGAGUGTT (SEQ ID NO : 1750)	1.3
RAG3A-1065	CTGCCCTCCCTGTCTCCTGT (SEQ ID NO : 867)	CUGCCUCCUCUGUCUCCUGUTT (SEQ ID NO : 1309)	ACAGGAGACAGGAGGCAGTT (SEQ ID NO : 1751)	1.3
RAG3A-523	GCGCACATACATGTGCCCC (SEQ ID NO : 868)	GCGCACAUACAUGUGCCCCCTT (SEQ ID NO : 1310)	GGGCACAUGUAUGUGCGCTT (SEQ ID NO : 1752)	1.3
RAG3A-590	TAGCCATCTAAGCCACTGG (SEQ ID NO : 869)	UAGCCAUUAAGCCACUGGTT (SEQ ID NO : 1311)	CCAGUGGCUUAGAUGGCUATT (SEQ ID NO : 1753)	1.3
RAG3A-505	CGCACCTGACAGTCCACTC (SEQ ID NO : 870)	CGCACCUGACAGUCCACUCTT (SEQ ID NO : 1312)	GAGUGGACUGUCAGGUGCGTT (SEQ ID NO : 1754)	1.3
RAG3A-1247	CTAGCCAGAAACCGGCAGC (SEQ ID NO : 871)	CUAGCCAGAAACCGGCAGCTT (SEQ ID NO : 1313)	GCUGCCGGUUUCUGGCUAGTT (SEQ ID NO : 1755)	1.3
RAG3A-1281	CGCTCCTCATCTTGTGTT (SEQ ID NO : 872)	CGCUCCUCAUUCUUGUGUUTT (SEQ ID NO : 1314)	AACACAAGAAUGAGGAGCGTT (SEQ ID NO : 1756)	1.3
RAG3A-747	GCAGGGAGGTATTGCGGG (SEQ ID NO : 873)	GCAGGGAGGUAAUUGCGGGTT (SEQ ID NO : 1315)	CCCGCAAUAACCUCCUGCTT (SEQ ID NO : 1757)	1.3
RAG3A-1220	TTCTGTGGAGTGACAGTAT (SEQ ID NO : 874)	UUCUGGGAGUGACAGUAUTT (SEQ ID NO : 1316)	AUACUGACUCCACAGAATT (SEQ ID NO : 1758)	1.3
RAG3A-1268	TGTGTTACCCAGGACAGGG (SEQ ID NO : 875)	UGUGUUAACCCAGGACAGGGTT (SEQ ID NO : 1317)	CCUGUCCUGGGUAACACATT (SEQ ID NO : 1759)	1.3

RAG3A-782	GAGCTAGAGCCAGGGCCAA (SEQ ID NO : 876)	GAGCUAGAGCCAGGGCCAATT (SEQ ID NO : 1318)	UUGGCCCUGGCUCUAGCUCTT (SEQ ID NO : 1760)	1.3
RAG3A-107	GTGTGGGTGGAGGAGTGGA (SEQ ID NO : 877)	GUGUGGGUGGAGGAGUGGATT (SEQ ID NO : 1319)	UCCACUCCUCCACCCACACTT (SEQ ID NO : 1761)	1.3
RAG3A-923	ACATGCCCATCCTTGGGGA (SEQ ID NO : 878)	ACAUGCCCAUCCUUGGGGATT (SEQ ID NO : 1320)	UCCCCAAGGAUGGGCAUGUTT (SEQ ID NO : 1762)	1.3
RAG3A-349	AAAGCAAGCATCCTGTTGG (SEQ ID NO : 879)	AAAGCAAGCAUCCUGUUGGTT (SEQ ID NO : 1321)	CCAACAGGAUGCUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1763)	1.3
RAG3A-1085	TCTTGGTTCCCTGGTTCATG (SEQ ID NO : 880)	UCUUGGUUCCUGGUGCAUGTT (SEQ ID NO : 1322)	CAUGACCAGGGAACCAAGATT (SEQ ID NO : 1764)	1.3
RAG3A-432	ATGTGGGCAATATCCGTGT (SEQ ID NO : 881)	AUGUGGGCAAUAUCCGUGUTT (SEQ ID NO : 1323)	ACACGGAUAUUGCCCCACAUTT (SEQ ID NO : 1765)	1.3
RAG3A-129	ATCCAAATCTTCTCCGTGG (SEQ ID NO : 882)	AUCCAAAUUCUCCGUGGTT (SEQ ID NO : 1324)	CCACGGAGAAGAUUUGGAUTT (SEQ ID NO : 1766)	1.3
RAG3A-830	CCTGAGGACAGAGACTGTG (SEQ ID NO : 883)	CCUGAGGACAGAGACUGUGTT (SEQ ID NO : 1325)	CACAGUCUCUGUCCUCAGGTT (SEQ ID NO : 1767)	1.3
RAG3A-74	GGGGCTCCAGGGAAGAGAA (SEQ ID NO : 884)	GGGGCUCAGGGAAGAGAATT (SEQ ID NO : 1326)	UUCUCUCCCCUGGAGCCCCTT (SEQ ID NO : 1768)	1.3
RAG3A-856	TGGGATCAAGGTCAGGCCA (SEQ ID NO : 885)	UGGGAUCAAGGUCAGGCCATT (SEQ ID NO : 1327)	UGGCCUGACCUUGAUCCCCATT (SEQ ID NO : 1769)	1.3
RAG3A-435	CTCATGTGGGCAATATCCG (SEQ ID NO : 886)	CUCAUGUGGGCAAUAUCCGTT (SEQ ID NO : 1328)	CGGAUAUUGCCCCACAUGAGTT (SEQ ID NO : 1770)	1.3
RAG3A-564	CAGACGAGCACCTAAGCTC (SEQ ID NO : 887)	CAGACGAGCACCUAAGCUCTT (SEQ ID NO : 1329)	GAGCUUAGGUGCUCGUCUGTT (SEQ ID NO : 1771)	1.3
RAG3A-1251	GGACCTAGCCAGAAACCGG (SEQ ID NO : 888)	GGACCUAGCCAGAAACCGTT (SEQ ID NO : 1330)	CCGGUUUCUGGCUAGGUCCTT (SEQ ID NO : 1772)	1.3
RAG3A-1291	TCTCTGAGGTCGCTCCTCA (SEQ ID NO : 889)	UCUCUGAGGUCGCUCUCUATT (SEQ ID NO : 1331)	UGAGGAGCGACCUCAGAGATT (SEQ ID NO : 1773)	1.3
RAG3A-781	AGCTAGAGCCAGGGCCAAA (SEQ ID NO : 890)	AGCUAGAGCCAGGGCCAAATT (SEQ ID NO : 1332)	UUUGGCCCUGGCUCUAGCUTT (SEQ ID NO : 1774)	1.3
RAG3A-261	CTTAACAAGACCTCTGTG (SEQ ID NO : 891)	CUUAAACAAGACCUCUGUGTT (SEQ ID NO : 1333)	CACAGAGGUCUUGUUUAAGTT (SEQ ID NO : 1775)	1.3

RAG3A-1098	CCAGCCTCCTTICTCTTGG (SEQ ID NO : 892)	CCAGCCUCCUUUCUUGGTT (SEQ ID NO : 1334)	CCAAGAGAAAGGAGGCUGGTT (SEQ ID NO : 1776)	1.3
RAG3A-565	GCAGACGAGCACCTAAGCT (SEQ ID NO : 893)	GCAGACGAGCACCUAAGCUTT (SEQ ID NO : 1335)	AGCUUAGGUGCUCGUCUGCTT (SEQ ID NO : 1777)	1.2
RAG3A-930	TCAGCAGACATGCCCATCC (SEQ ID NO : 894)	UCAGCAGACAUGCCCAUCCTT (SEQ ID NO : 1336)	GGAUGGGCAUGUCUGCUGATT (SEQ ID NO : 1778)	1.2
RAG3A-422	TATCCGTGTTCCTCCACTTCG (SEQ ID NO : 895)	UAUCCGUGUCCCAUUCGTT (SEQ ID NO : 1337)	CGAAGUGGGAACACGGAUATT (SEQ ID NO : 1779)	1.2
RAG3A-516	TACATGTGCCCGCACCTG (SEQ ID NO : 896)	UACAUGUGCCCCGCACCUGTT (SEQ ID NO : 1338)	CAGGUGCGGGGCACAUGUATT (SEQ ID NO : 1780)	1.2
RAG3A-1190	TGTAACCTTATCCTCAGGCG (SEQ ID NO : 897)	UGUAACUUAUCCUCAGGCGTT (SEQ ID NO : 1339)	CGCCUGAGGAUAAGUUACATT (SEQ ID NO : 1781)	1.2
RAG3A-360	AGAAAAGCAGGAAGCAAG (SEQ ID NO : 898)	AGAAAAGCAGGAAGCAAGTT (SEQ ID NO : 1340)	CUUGCUUUCCUGCUUUUCUTT (SEQ ID NO : 1782)	1.2
RAG3A-126	CAAATCTTCTCCGTGGTGT (SEQ ID NO : 899)	CAAAUCUUCUCCGUGGUGUTT (SEQ ID NO : 1341)	ACACCACGGAGAAGAUUUGTT (SEQ ID NO : 1783)	1.2
RAG3A-938	CACACTTCTCAGCAGACAT (SEQ ID NO : 900)	CACACUUCUCAGCAGACAUTT (SEQ ID NO : 1342)	AUGUCUGCUGAGAAAGUGGTT (SEQ ID NO : 1784)	1.2
RAG3A-853	GATCAAGGTCAGGCCAGGA (SEQ ID NO : 901)	GAUCAAGGUCAGGCCAGGATT (SEQ ID NO : 1343)	UCCUGGCCUGACCUUGAUCTT (SEQ ID NO : 1785)	1.2
RAG3A-716	GCTGTCTTTCCTAAGACAG (SEQ ID NO : 902)	GCUGUCUUUCCUAAGACAGTT (SEQ ID NO : 1344)	CUGUCUUAAGAAAGACAGCTT (SEQ ID NO : 1786)	1.2
RAG3A-1027	CCACTATCCTCCCAGCTAT (SEQ ID NO : 903)	CCACUAUCCUCCAGCUAUTT (SEQ ID NO : 1345)	AUAGCUGGGAGGAUAGUGGTT (SEQ ID NO : 1787)	1.2
RAG3A-640	CGGAGACAGAAAGCAAA (SEQ ID NO : 904)	CGGAGACAGAAACAAGCAAATT (SEQ ID NO : 1346)	UUUGCUUGUUUCUGUCUCCGTT (SEQ ID NO : 1788)	1.2
RAG3A-284	CAGGGAGTGAAAACCCAC (SEQ ID NO : 905)	CAGGGAGUGAAAACCCCACTT (SEQ ID NO : 1347)	GUGGGUUUUCACUCCCGTT (SEQ ID NO : 1789)	1.2
RAG3A-705	TAAGACAGGGACACATGGG (SEQ ID NO : 906)	UAAGACAGGGACACAUGGGTT (SEQ ID NO : 1348)	CCCAUGUGUCCUGUCUUATT (SEQ ID NO : 1790)	1.2
RAG3A-1315	TGCCTAGCCTGCCTCCCTA (SEQ ID NO : 907)	UGCCUAGCCUGCCUCCCUATT (SEQ ID NO : 1349)	UAGGGAGGCAGGCUAGGCATT (SEQ ID NO : 1791)	1.2

RAG3A-1381	TCCATCAGCCGATCTCCCC (SEQ ID NO : 908)	UCCAUCAGCCGAUCUCCCCCTT (SEQ ID NO : 1350)	GGGAGAUCGGCUGAUGGATT (SEQ ID NO : 1792)	1.2
RAG3A-558	AGCACCTAAGCTCAGGCTT (SEQ ID NO : 909)	AGCACCUAAGCUCAGGCUUTT (SEQ ID NO : 1351)	AAGCCUGAGCUUAGGUGCUTT (SEQ ID NO : 1793)	1.2
RAG3A-498	GACAGTCCACTCAACCCGT (SEQ ID NO : 910)	GACAGUCCACUCAACCCGUTT (SEQ ID NO : 1352)	ACGGGUUGAGUGGACUGUCTT (SEQ ID NO : 1794)	1.2
RAG3A-581	AAGCCACTGGACCCCAGCA (SEQ ID NO : 911)	AAGCCACUGGACCCCAGCATT (SEQ ID NO : 1353)	UGCUGGGGUCCAGUGGCUUTT (SEQ ID NO : 1795)	1.2
RAG3A-1135	CTTCACCCAAAGGGACCCCTC (SEQ ID NO : 912)	CUUCACCCCAAGGGACCCUCTT (SEQ ID NO : 1354)	GAGGGUCCCUUGGGUGAAGTT (SEQ ID NO : 1796)	1.2
RAG3A-1070	CATGCCTGCCTCCCTGTCT (SEQ ID NO : 913)	CAUGCCUGCCUCCCCUGUCUTT (SEQ ID NO : 1355)	AGACAGGGAGGCAGGCAUGTT (SEQ ID NO : 1797)	1.2
RAG3A-1181	TCCTCAGGGCGCATTCGACA (SEQ ID NO : 914)	UCCUCAGGCGCAUUCGACATT (SEQ ID NO : 1356)	UGUCGAUUGCGCCUGAGGATT (SEQ ID NO : 1798)	1.2
RAG3A-1206	AGTATCTCCCTCTCATTTGT (SEQ ID NO : 915)	AGUAUCUCCCUCUCAUUGUTT (SEQ ID NO : 1357)	ACAAUGAGAGGGAGAUACUTT (SEQ ID NO : 1799)	1.2
RAG3A-461	ACACCAACCCATAACAGGA (SEQ ID NO : 916)	ACACCAACCCAUAAACAGGATT (SEQ ID NO : 1358)	UCCUGUUAUGGGUUGGUGUTT (SEQ ID NO : 1800)	1.2
RAG3A-242	CTTCTTCCCCAGCAACACA (SEQ ID NO : 917)	CUUCUCCCCCAGCAACACATT (SEQ ID NO : 1359)	UGUGUUGCUGGGGAAGAAGTT (SEQ ID NO : 1801)	1.2
RAG3A-1127	AAGGACCCCTCTGCCTCTC (SEQ ID NO : 918)	AAGGACCCUCUGCCUCUCTT (SEQ ID NO : 1360)	GAGAGGCAGAGGGUCCCUUTT (SEQ ID NO : 1802)	1.2
RAG3A-419	CCGTGTTCCCACTTCGAAA (SEQ ID NO : 919)	CCGUGUCCCCACUUCGAAATT (SEQ ID NO : 1361)	UUUCGAAGUGGGAACACGGTT (SEQ ID NO : 1803)	1.2
RAG3A-790	AAGCAAAGGAGCTAGAGCC (SEQ ID NO : 920)	AAGCAAAGGAGCUAGAGCCTT (SEQ ID NO : 1362)	GGCUCUAGCUCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1804)	1.2
RAG3A-635	ACAGAAACAAGCAAAGGAGG (SEQ ID NO : 921)	ACAGAACAAGCAAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1363)	CCUCCUUUGCUUGUUCUGUTT (SEQ ID NO : 1805)	1.2
RAG3A-673	CTTGTCACATGTGGAACGG (SEQ ID NO : 922)	CUUGUCACAUGUGGAACGGTT (SEQ ID NO : 1364)	CCGUUCCACAUGUGACAAGTT (SEQ ID NO : 1806)	1.2
RAG3A-1001	CCCTCCTTCCTAATCTTGG (SEQ ID NO : 923)	CCCUCUCCUCCUAAUCUUGGTT (SEQ ID NO : 1365)	CCAAGAUUAGGAAGGAGGGTT (SEQ ID NO : 1807)	1.2

RAG3A-1005	AGCACCCCTCCTTCCTAATC (SEQ ID NO : 924)	AGCACCCUCCUCCUAAUCTT (SEQ ID NO : 1366)	GAUUAAGGAGGGUGCUTT (SEQ ID NO : 1808)	1.2
RAG3A-1064	TGCCTCCCTGTCTCCTGTC (SEQ ID NO : 925)	UGCCUCCUGUCUCCUGUCTT (SEQ ID NO : 1367)	GACAGGAGACAGGGAGGCATT (SEQ ID NO : 1809)	1.2
RAG3A-801	GACTGGGAAGAAAGCAAAG (SEQ ID NO : 926)	GACUGGGAAGAAAGCAAAGTT (SEQ ID NO : 1368)	CUUUGCUUUUCCAGUCTT (SEQ ID NO : 1810)	1.2
RAG3A-486	AACCCGTCCAACCCCTTTC (SEQ ID NO : 927)	AACCCGUCCAAACCCUUCTT (SEQ ID NO : 1369)	GAAAGGUUUGGACGGGUUTT (SEQ ID NO : 1811)	1.2
RAG3A-555	ACCTAAGCTCAGGCTTAAC (SEQ ID NO : 928)	ACCUAAGCUCAGGCUUAACTT (SEQ ID NO : 1370)	GUUAAGCCUGAGCUUAGGUTT (SEQ ID NO : 1812)	1.2
RAG3A-854	GGATCAAGGTCAGGCCAGG (SEQ ID NO : 929)	GGAUCAAGGUCAGGCCAGGTT (SEQ ID NO : 1371)	CCUGGCCUGACCUUGAUCCTT (SEQ ID NO : 1813)	1.2
RAG3A-1267	GTGTTACCCAGGACAGGGA (SEQ ID NO : 930)	GUGUACCCAGGACAGGGATT (SEQ ID NO : 1372)	UCCCUGUCCUGGGUAACTT (SEQ ID NO : 1814)	1.2
RAG3A-1264	TTACCCAGGACAGGGACCT (SEQ ID NO : 931)	UUACCCAGGACAGGGACCUTT (SEQ ID NO : 1373)	AGGUCCCUGUCCUGGUAATT (SEQ ID NO : 1815)	1.2
RAG3A-513	ATGTGCCCCGCACCTGACA (SEQ ID NO : 932)	AUGUGCCCCGCACCUGACATT (SEQ ID NO : 1374)	UGUCAGGUGCGGGGCACAUTT (SEQ ID NO : 1816)	1.2
RAG3A-1286	GAGGTCGCTCCTCATTTCT (SEQ ID NO : 933)	GAGGUCGCUCCUCAUUCUUTT (SEQ ID NO : 1375)	AAGAUGAGGAGCGACCUCTT (SEQ ID NO : 1817)	1.2
RAG3A-653	AGGAGATGGAAGACGGAGA (SEQ ID NO : 934)	AGGAGAUGGAAGACGGAGATT (SEQ ID NO : 1376)	UCUCCGUUUCCAUCCUCTT (SEQ ID NO : 1818)	1.2
RAG3A-1014	AGCTATCCCAGCACCTCC (SEQ ID NO : 935)	AGCUAUCCCAGCACCCUCCCTT (SEQ ID NO : 1377)	GGAGGGUGCUGGGGAUAGCUTT (SEQ ID NO : 1819)	1.2
RAG3A-61	AGAGAAGGCGTCACTTCCG (SEQ ID NO : 936)	AGAGAAGGCGUCACUUCGTT (SEQ ID NO : 1378)	CGGAAGUGACGCCUUCUCUTT (SEQ ID NO : 1820)	1.2
RAG3A-666	CATGTGGAACGGTAGGAGA (SEQ ID NO : 937)	CAUGUGGAACGGUAGGAGATT (SEQ ID NO : 1379)	UCUCCUACCGUUCACCAUGTT (SEQ ID NO : 1821)	1.2
RAG3A-348	AAGCAAGCATCCTGTTGGA (SEQ ID NO : 938)	AAGCAAGCAUCCUGUUGGATT (SEQ ID NO : 1380)	UCCAACAGGAUGCUUGCUUTT (SEQ ID NO : 1822)	1.2
RAG3A-545	AGGCTTAACCCAGTGCACG (SEQ ID NO : 939)	AGGCUUAACCCAGUGCACGTT (SEQ ID NO : 1381)	CGUGCACUGGGUUAAGCCUTT (SEQ ID NO : 1823)	1.2

RAG3A-584	TCTAAGCCACTGGACCCCA (SEQ ID NO : 940)	UCUAAGCCACUGGACCCATT (SEQ ID NO : 1382)	UGGGGUCCAGUGGCUUAGATT (SEQ ID NO : 1824)	1.2
RAG3A-1162	GTCCCCCTCTTGCTTTCTCA (SEQ ID NO : 941)	GUCCCCUCUUGCUUUCUCATT (SEQ ID NO : 1383)	UGAGAAAGCAAGAGGGGACTT (SEQ ID NO : 1825)	1.2
RAG3A-308	CCAGGGAAAGAAAATTTGG (SEQ ID NO : 942)	CCAGGGAAAGAAAUUUGGTT (SEQ ID NO : 1384)	CCAAAUUUCUUUCCCCUGGTT (SEQ ID NO : 1826)	1.2
RAG3A-158	CCCATGTCCAGGAAAAGAT (SEQ ID NO : 943)	CCCAUGUCCAGGAAAAGAU TT (SEQ ID NO : 1385)	AUCUUUUCUGGACAUGGGTT (SEQ ID NO : 1827)	1.2
RAG3A-161	TTGCCCATGTCCAGGAAA (SEQ ID NO : 944)	UUGCCCAUGUCCAGGAAAATT (SEQ ID NO : 1386)	UUUUCUGGACAUGGGCAATT (SEQ ID NO : 1828)	1.2
RAG3A-1253	AGGGACCTAGCCAGAAACC (SEQ ID NO : 945)	AGGGACCUAGCCAGAAACCTT (SEQ ID NO : 1387)	GGUUUCUGGCUAGGUCCCUTT (SEQ ID NO : 1829)	1.2
RAG3A-926	CAGACATGCCCATCCTTGG (SEQ ID NO : 946)	CAGACAUGCCCAUCCUUGGTT (SEQ ID NO : 1388)	CCAAGGAUGGCAUGUCUGTT (SEQ ID NO : 1830)	1.2
RAG3A-1191	TTGTAACTTATCCTCAGGC (SEQ ID NO : 947)	UUGUAACUUAUCCUCAGGCTT (SEQ ID NO : 1389)	GCCUGAGGAUAAGUUAACAATT (SEQ ID NO : 1831)	1.2
RAG3A-697	GGACACATGGGCCTGGTTA (SEQ ID NO : 948)	GGACACAUGGGCCUGGUUATT (SEQ ID NO : 1390)	UAACCAGGCCCAUGUGUCCTT (SEQ ID NO : 1832)	1.2
RAG3A-1224	CCCCTTCTGTGGAGTGACA (SEQ ID NO : 949)	CCCCUUCUGUGGAGUGACATT (SEQ ID NO : 1391)	UGUCACUCCACAGAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1833)	1.2
RAG3A-964	GGACGGGAAATTCAGGA (SEQ ID NO : 950)	GGACGGGAAAUAUCCAGGATT (SEQ ID NO : 1392)	UCCUGGAAUUUCCCCGUCCTT (SEQ ID NO : 1834)	1.2
RAG3A-791	AAAGCAAAGGAGCTAGAGC (SEQ ID NO : 951)	AAAGCAAAGGAGCUAGAGCTT (SEQ ID NO : 1393)	GCUCUAGCUCCUUUGCUUUTT (SEQ ID NO : 1835)	1.2
RAG3A-526	TGTGCGCACATACATGTGC (SEQ ID NO : 952)	UGUGCGCACAUACAUGUGCTT (SEQ ID NO : 1394)	GCACAUGUAUGUGCGCACATT (SEQ ID NO : 1836)	1.2
RAG3A-972	GTCTGGCTGGACGGGAAA (SEQ ID NO : 953)	GUCUGGCUGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO : 1395)	UUUUCCCGUCCAGCCAGACTT (SEQ ID NO : 1837)	1.2
RAG3A-289	ATAGCCAGGGAGTGAAAAC (SEQ ID NO : 954)	AUAGCCAGGGAGUGAAAAC TT (SEQ ID NO : 1396)	GUUUUCACUCCCUUGGCUAUTT (SEQ ID NO : 1838)	1.2
RAG3A-255	CAAGACCTCTGTGCTTCTT (SEQ ID NO : 955)	CAAGACCUUCUGUGCUUCUUTT (SEQ ID NO : 1397)	AAGAAGCACAGAGGUCUUGTT (SEQ ID NO : 1839)	1.2

RAG3A-1000	CCTCCTTCCTAATCTTGGG (SEQ ID NO : 956)	CCUCCUCCUAAUCUUGGGTT (SEQ ID NO : 1398)	CCCAAGAUUAGGAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1840)	1.2
RAG3A-694	CACATGGGCCTGGTTATTC (SEQ ID NO : 957)	CACAUGGGCCUGGUUAUUCTT (SEQ ID NO : 1399)	GAAUAAACCAGGCCCAUGUGTT (SEQ ID NO : 1841)	1.2
RAG3A-549	GCTCAGGCTTAACCCAGTG (SEQ ID NO : 958)	GCUCAGGCUUAACCCAGUGTT (SEQ ID NO : 1400)	CACUGGGUUAAGCCUGAGCTT (SEQ ID NO : 1842)	1.2
RAG3A-1240	GAAACCGGCAGCATTCCTCC (SEQ ID NO : 959)	GAAACCGGCAGCAUUCCTT (SEQ ID NO : 1401)	GGGGAUUGCUGCCGGUUUCTT (SEQ ID NO : 1843)	1.2
RAG3A-978	CATCTCGTCTGGCTGGACG (SEQ ID NO : 960)	CAUCUCGUCUGGCUGGACGTT (SEQ ID NO : 1402)	CGUCCAGCCAGACGAGAUGTT (SEQ ID NO : 1844)	1.2
RAG3A-1290	CTCTGAGGTCGCTCCTCAT (SEQ ID NO : 961)	CUCUGAGGUCGCUCUCAUTT (SEQ ID NO : 1403)	AUGAGGAGCGACCUACAGAGTT (SEQ ID NO : 1845)	1.2
RAG3A-1006	CAGCACCTCCTTCCTAAT (SEQ ID NO : 962)	CAGCACCCUCCUCCUAUTT (SEQ ID NO : 1404)	AUUAGGAAGGAGGGUGCUGTT (SEQ ID NO : 1846)	1.2
RAG3A-1311	TAGCCTGCCTCCTACCTT (SEQ ID NO : 963)	UAGCCUGCCUCCCUACCUUTT (SEQ ID NO : 1405)	AAGGUAGGAGGCAGGCUATT (SEQ ID NO : 1847)	1.2
RAG3A-42	GGGGCCTTCACCAGTGTCT (SEQ ID NO : 964)	GGGGCCUUCACCAGUGUCUTT (SEQ ID NO : 1406)	AGACACUGGUGAAGGCCCTT (SEQ ID NO : 1848)	1.2
RAG3A-21	TGGCTCCCTTCTCTGATTG (SEQ ID NO : 965)	UGGCUCCCUUCUCUGAUUGTT (SEQ ID NO : 1407)	CAAUCAGAGAAGGGAGCCATT (SEQ ID NO : 1849)	1.2
RAG3A-59	AGAAGGCGTCACTTCCGGG (SEQ ID NO : 966)	AGAAGGCGUCACUUCCTGGGT (SEQ ID NO : 1408)	CCCGAAGUGACGCCUUCUTT (SEQ ID NO : 1850)	1.2
RAG3A-1187	AACTATCCTCAGGCGCAT (SEQ ID NO : 967)	AACUUAUCCUCAGGCGCAUTT (SEQ ID NO : 1409)	AUGCGCCUGAGGAUAAGUUTT (SEQ ID NO : 1851)	1.2
RAG3A-576	ACTGGACCCAGCAGACGA (SEQ ID NO : 968)	ACUGGACCCAGCAGACGATT (SEQ ID NO : 1410)	UCGUCUGCGGGGCCAGUTT (SEQ ID NO : 1852)	1.1
RAG3A-639	GGAGACAGAAACAAGCAAAG (SEQ ID NO : 969)	GGAGACAGAAACAAGCAAAGTT (SEQ ID NO : 1411)	CUUUGCUUGUUCUGUCUCCTT (SEQ ID NO : 1853)	1.1
RAG3A-815	TGTGGGAGACTGGGACTG (SEQ ID NO : 970)	UGUGGGGAGACUGGGACUGTT (SEQ ID NO : 1412)	CAGUCCAGUCUCCCCACATT (SEQ ID NO : 1854)	1.1
RAG3A-957	AAAATTCCAGGATCTAGGC (SEQ ID NO : 971)	AAA AUUCCAGGAUCUAGGCTT (SEQ ID NO : 1413)	GCCUAGAUCUGGAUUUUTT (SEQ ID NO : 1855)	1.1

RAG3A-1217	TGTGGAGTGACAGTATCTC (SEQ ID NO : 972)	UGUGGAGUGACAGUAUCUCTT (SEQ ID NO : 1414)	GAGUACUGUCACUCCACATT (SEQ ID NO : 1856)	1.1
RAG3A-1165	ACAGTCCCCTCTTGCTTTC (SEQ ID NO : 973)	ACAGUCCCUCUUGCUUUCTT (SEQ ID NO : 1415)	GAAAGCAAGAGGGGACUGUTT (SEQ ID NO : 1857)	1.1
RAG3A-1134	TTCACCCCAAGGGACCCCTCT (SEQ ID NO : 974)	UUCACCCCAAGGGACCCUCUTT (SEQ ID NO : 1416)	AGAGGGUCCCUUGGGUGAATT (SEQ ID NO : 1858)	1.1
RAG3A-667	ACATGTGGAACGGTAGGAG (SEQ ID NO : 975)	ACAUGUGGAACGGUAGGAGTT (SEQ ID NO : 1417)	CUCCUACCGUUCACACAUGUTT (SEQ ID NO : 1859)	1.1
RAG3A-1339	CAAACCCCTCACCCCTCTCT (SEQ ID NO : 976)	CAAACCCUCACCCUCUCTT (SEQ ID NO : 1418)	AGAGGGUGGUGAGGGUUUUGTT (SEQ ID NO : 1860)	1.1
RAG3A-676	CCTCTTGTCACATGTGGAA (SEQ ID NO : 977)	CCUCUUGUCACAUGUGGAATT (SEQ ID NO : 1419)	UCCACAUUGUGACAAGAGGTT (SEQ ID NO : 1861)	1.1
RAG3A-153	GTCCAGGAAGAAGATGGATC (SEQ ID NO : 978)	GUCCAGGAAGAAGAUUGAUCTT (SEQ ID NO : 1420)	GAUCCAUCUUUCCUGGACTT (SEQ ID NO : 1862)	1.1
RAG3A-320	CAGGTATGATGTCCAGGGA (SEQ ID NO : 979)	CAGGUAUGAUGUCCAGGGATT (SEQ ID NO : 1421)	UCCUGGACAUCAUACCUGTT (SEQ ID NO : 1863)	1.1
RAG3A-1010	ATCCAGCACCCCTCCTTCC (SEQ ID NO : 980)	AUCCAGCACCCUCCUUCCTT (SEQ ID NO : 1422)	GGAAGGAGGUGUGCGGAUTT (SEQ ID NO : 1864)	1.1
RAG3A-999	CTCCTTCCTAATCTTGGA (SEQ ID NO : 981)	CUCCUCCUAUCUUGGGATT (SEQ ID NO : 1423)	UCCCAAGAUUAGGAAGGAGTT (SEQ ID NO : 1865)	1.1
RAG3A-567	CAGCAGACGAGCACCTAAG (SEQ ID NO : 982)	CAGCAGACGAGCACCUAAGTT (SEQ ID NO : 1424)	CUUAGGUGCUCGUCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1866)	1.1
RAG3A-862	GGATGATGGGATCAAGGTC (SEQ ID NO : 983)	GGAUGAUGGGAUCAAGGUCTT (SEQ ID NO : 1425)	GACCUUGAUCCCAUCAUCCTT (SEQ ID NO : 1867)	1.1
RAG3A-460	CACCAACCCATAACAGGAG (SEQ ID NO : 984)	CACCAACCCAUAAACAGGAGTT (SEQ ID NO : 1426)	CUCCUGUUAUGGGUUGGUGTT (SEQ ID NO : 1868)	1.1
RAG3A-921	ATGCCCATCCTTGGGGAGG (SEQ ID NO : 985)	AUGCCCAUCCUUGGGGAGGTT (SEQ ID NO : 1427)	CCUCCCCAAGGAUGGGCAUTT (SEQ ID NO : 1869)	1.1
RAG3A-704	AAGACAGGGACACATGGGC (SEQ ID NO : 986)	AAGACAGGGACACAUGGGGCTT (SEQ ID NO : 1428)	GCCCAUGUGUCCUGUCUUTT (SEQ ID NO : 1870)	1.1
RAG3A-233	CAGCAACACAAATGTCCTG (SEQ ID NO : 987)	CAGCAACACAAAUUGUCCUGTT (SEQ ID NO : 1429)	CAGGACAUAUUGUGUUGCUGTT (SEQ ID NO : 1871)	1.1

RAG3A-1203	ATCTCCCTCTCATTTGTAAC (SEQ ID NO : 988)	AUCUCCUCUCAUUGUAAC TT (SEQ ID NO : 1430)	GUUACAAUGAGAGGGAUTT (SEQ ID NO : 1872)	1.1
RAG3A-247	CTGTGCTTCTTCCCCAGCA (SEQ ID NO : 989)	CUGUCUUCUCCCCAGCAT T (SEQ ID NO : 1431)	UGCUGGGAAGAAGCACAGTT (SEQ ID NO : 1873)	1.1
RAG3A-721	CAGCAGCTGTCTTTCCTAA (SEQ ID NO : 990)	CAGCAGCUGUCUUUCCUAAT T (SEQ ID NO : 1432)	UUAGGAAAGACAGCUGCUGTT (SEQ ID NO : 1874)	1.1
RAG3A-391	ACAAGATAGGACTCCCTAG (SEQ ID NO : 991)	ACAAGAUAGGACUCCCUAGTT (SEQ ID NO : 1433)	CUAGGGAGUCCUAUCUUGUTT (SEQ ID NO : 1875)	1.1
RAG3A-159	GCCCATGTCCAGGAAAAGA (SEQ ID NO : 992)	GCCCAUGUCCAGGAAAAGATT (SEQ ID NO : 1434)	UCUUUUCCUGGACAUGGGCTT (SEQ ID NO : 1876)	1.1
RAG3A-437	CTCTCATGTGGGCAATATC (SEQ ID NO : 993)	CUCUCAUGUGGGCAUAUUCTT (SEQ ID NO : 1435)	GAUAUUGCCCAUGAGAGATT (SEQ ID NO : 1877)	1.1
RAG3A-29	GTGTCTGGTGGCTCCCTTC (SEQ ID NO : 994)	GUGUCUGGUGGCUCUCCUUCTT (SEQ ID NO : 1436)	GAAGGGAGCCACCAGACACTT (SEQ ID NO : 1878)	1.1
RAG3A-63	GAAGAGAAGGCGTCACTTC (SEQ ID NO : 995)	GAAGAGAAGGCGUCACUUCTT (SEQ ID NO : 1437)	GAAGUGACGCCUUCUCUUCTT (SEQ ID NO : 1879)	1.1
RAG3A-996	CTTCCTAATCTTGGGAGAC (SEQ ID NO : 996)	CUUCCUAUCUUGGGAGACTT (SEQ ID NO : 1438)	GUCUCCCAAGAUUAGGAAGTT (SEQ ID NO : 1880)	1.1
RAG3A-1083	TTGGTTCCCTGGTCATGCC (SEQ ID NO : 997)	UUGGUUCCCUUGGUCAUGCCTT (SEQ ID NO : 1439)	GGCAUGACCAGGGAACCAATT (SEQ ID NO : 1881)	1.1
RAG3A-1128	CAAGGGACCCCTCTGCCTCT (SEQ ID NO : 998)	CAAGGGACCCUCUGCCUCUTT (SEQ ID NO : 1440)	AGAGGCAGAGGGUCCCUUGTT (SEQ ID NO : 1882)	1.1
RAG3A-1094	CCTCCTTCTCTTGTTCC (SEQ ID NO : 999)	CCUCCUUUCUCUUGGUUCCTT (SEQ ID NO : 1441)	GGAACCAAGAGAAAGGAGGTT (SEQ ID NO : 1883)	1.1
RAG3A-771	AGGGCCAAAAGGAAAAGGGG (SEQ ID NO : 1000)	AGGGCCAAAGGAAAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1442)	CCCCUUUCCUUUGGCCUUTT (SEQ ID NO : 1884)	1.1
RAG3A-287	AGCCAGGGAGTGAAAACCC (SEQ ID NO : 1001)	AGCCAGGGAGUGAAACCCCTT (SEQ ID NO : 1443)	GGGUUUUACUCCCGGCUTT (SEQ ID NO : 1885)	1.1
RAG3A-981	AGACATCTCGTCTGGCTGG (SEQ ID NO : 1002)	AGACAUCUCGUCUGGCUGGTT (SEQ ID NO : 1444)	CCAGCCAGACGAGAUGUCUTT (SEQ ID NO : 1886)	1.1
RAG3A-23	GGTGGCTCCCTTCTCTGAT (SEQ ID NO : 1003)	GGUGGCUCUCCUUCUCUGAUTT (SEQ ID NO : 1445)	AUCAGAGAAGGAGCCACCTT (SEQ ID NO : 1887)	1.1

RAG3A-1072	GTCATGCCCTGCCCTCCTGT (SEQ ID NO : 1004)	GUCAUGCCUGCCUCCUGUTT (SEQ ID NO : 1446)	ACAGGAGGCAGGCAUGACTT (SEQ ID NO : 1888)	1.1
RAG3A-415	GTTCCTCACTTCGAAAGGG (SEQ ID NO : 1005)	GUUCCACUUCGAAAGGGGTT (SEQ ID NO : 1447)	CCCUUUCGAAGUGGGAATT (SEQ ID NO : 1889)	1.1
RAG3A-1287	TGAGGTCGCTCCTCATTTCT (SEQ ID NO : 1006)	UGAGGUCGCUCUCAUUCUTT (SEQ ID NO : 1448)	AGAAUGAGGAGCGACCUCATT (SEQ ID NO : 1890)	1.1
RAG3A-1201	CTCCCTCTCATTTGTAATT (SEQ ID NO : 1007)	CUCCCUCAUUGUAAAUUTT (SEQ ID NO : 1449)	AAGUACAUAUGAGAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1891)	1.1
RAG3A-772	CAGGGCCAAAGGAAAAGGG (SEQ ID NO : 1008)	CAGGGCCAAAGGAAAAGGGTT (SEQ ID NO : 1450)	CCCUUUUCCUUUGGCCCUUTT (SEQ ID NO : 1892)	1.1
RAG3A-1249	ACCTAGCCAGAAACCGGCA (SEQ ID NO : 1009)	ACCUAGCCAGAAACCGGCATT (SEQ ID NO : 1451)	UGCCGGUUUCUGGCUAGGUTT (SEQ ID NO : 1893)	1.1
RAG3A-546	CAGGCTTAACCCAGTGCAC (SEQ ID NO : 1010)	CAGGCUUAACCCAGUGCACTT (SEQ ID NO : 1452)	GUGCACUGGGUUAAGCCUGTT (SEQ ID NO : 1894)	1.1
RAG3A-160	TGCCCATGTCCAGGAAAAG (SEQ ID NO : 1011)	UGCCCAUGUCCAGGAAAAGTT (SEQ ID NO : 1453)	CUUUUCCUGGACAUGGGCATT (SEQ ID NO : 1895)	1.1
RAG3A-64	GGAAGAGAAGGCGTCACTT (SEQ ID NO : 1012)	GGAAGAGAAGGCGUCACUUTT (SEQ ID NO : 1454)	AAGUGACGCCUUCUCUUCCTT (SEQ ID NO : 1896)	1.1
RAG3A-1002	ACCCTCCTTCCTAATCTTG (SEQ ID NO : 1013)	ACCUCUUCUUAUUCUUGTT (SEQ ID NO : 1455)	CAAGAUUAGGAAGGAGGUTT (SEQ ID NO : 1897)	1.1
RAG3A-1288	CTGAGGTCGCTCCTCATTC (SEQ ID NO : 1014)	CUGAGGUCGCUCUCAUUCTT (SEQ ID NO : 1456)	GAAUGAGGAGCGACCUCAGTT (SEQ ID NO : 1898)	1.1
RAG3A-891	AGAGCCTGAGGAAGTTCTG (SEQ ID NO : 1015)	AGAGCCUGAGGAAGUUCUGTT (SEQ ID NO : 1457)	CAGAACUCCUCAGGCUCUTT (SEQ ID NO : 1899)	1.1
RAG3A-231	GCAACACAAATGTCCTGCC (SEQ ID NO : 1016)	GCAACACAAUUGUCCUGCCTT (SEQ ID NO : 1458)	GGCAGGACAUUUGUUGCTT (SEQ ID NO : 1900)	1.1
RAG3A-669	TCACATGTGGAACGGTAGG (SEQ ID NO : 1017)	UCACAUGUGGAACGGUAGGTT (SEQ ID NO : 1459)	CCUACCGUCCACAUGUGATT (SEQ ID NO : 1901)	1.1
RAG3A-1009	TCCAGCACCTCCTTCCT (SEQ ID NO : 1018)	UCCCAGCACCCUCCUUCCTT (SEQ ID NO : 1460)	AGGAAGGAGGGUGCUGGGATT (SEQ ID NO : 1902)	1.1
RAG3A-656	GGTAGGAGATGGAAGACGG (SEQ ID NO : 1019)	GGUAGGAGAUGGAAGACGGTT (SEQ ID NO : 1461)	CCGUCUCCAUCCUACCTT (SEQ ID NO : 1903)	1.1

RAG3A-229	AACACAAATGTCCTGCCAG (SEQ ID NO : 1020)	AACACAAUGUCCUGCCAGTT (SEQ ID NO : 1462)	CUGGCAGGACAUUUGUGUUTT (SEQ ID NO : 1904)	1.1
RAG3A-484	CCCGTCCAAACCCCTTTCC (SEQ ID NO : 1021)	CCCGUCCAAACCCUUUCCCTT (SEQ ID NO : 1463)	GGGAAAGGUUUGGACGGGTT (SEQ ID NO : 1905)	1.1
RAG3A-799	CTGGGAAGAAAGCAAAGGA (SEQ ID NO : 1022)	CUGGGAAGAAAGCAAAGGATT (SEQ ID NO : 1464)	UCCUUUGCUUUCUCCAGTT (SEQ ID NO : 1906)	1.1
RAG3A-296	AATTGTGATAGCCAGGGAG (SEQ ID NO : 1023)	AAUUUGGAUAGCCAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1465)	CUCCUGGCUAUCCAAAUUTT (SEQ ID NO : 1907)	1.1
RAG3A-1183	TATCCTCAGGCGCATTCGA (SEQ ID NO : 1024)	UAUCCUCAGGCGCAUUCGATT (SEQ ID NO : 1466)	UCGAAUGCGCCUGAGGAUATT (SEQ ID NO : 1908)	1.1
RAG3A-380	CTCCCTAGGGGATTACAGA (SEQ ID NO : 1025)	CUCCCUAGGGGAUACAGATT (SEQ ID NO : 1467)	UCUGUAAUCCCCUAGGGAGTT (SEQ ID NO : 1909)	1.1
RAG3A-157	CCATGTCCAGGAAAAGATG (SEQ ID NO : 1026)	CCAUGUCCAGGAAAAGAUGTT (SEQ ID NO : 1468)	CAUCUUUCCUGGACAUGGTT (SEQ ID NO : 1910)	1.1
RAG3A-1185	CTTATCCTCAGGCGCATTC (SEQ ID NO : 1027)	CUUAUCCUCAGGCGCAUUCTT (SEQ ID NO : 1469)	GAAUGCGCCUGAGGAUAAGTT (SEQ ID NO : 1911)	1.1
RAG3A-1244	GCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO : 1028)	GCCAGAAACCGGCAGCAUUTT (SEQ ID NO : 1470)	AAUGCUGCCGUUUCUGGCTT (SEQ ID NO : 1912)	1.1
RAG3A-588	GCCATCTAAGCCACTGGAC (SEQ ID NO : 1029)	GCCAUCUAAGCCACUGGACTT (SEQ ID NO : 1471)	GUCCAGUGGCUUAGAUGGCTT (SEQ ID NO : 1913)	1.1
RAG3A-436	TCTCATGTGGGCAATATCC (SEQ ID NO : 1030)	UCUCAUGUGGGCAAUAUCCTT (SEQ ID NO : 1472)	GGAUAUUGCCCAUAUGAGATT (SEQ ID NO : 1914)	1.1
RAG3A-1029	ACCCACTATCCTCCCAGCT (SEQ ID NO : 1031)	ACCCACUAUCCUCCCAGCUTT (SEQ ID NO : 1473)	AGCUGGAGGAUAGUGGGUTT (SEQ ID NO : 1915)	1.1
RAG3A-28	TGTCTGGTGGCTCCCTTCT (SEQ ID NO : 1032)	UGUCUGGUGGCUCUCCUUCUTT (SEQ ID NO : 1474)	AGAAGGGAGCCACCAGACATT (SEQ ID NO : 1916)	1.1
RAG3A-234	CCAGCAACACAAATGTCCT (SEQ ID NO : 1033)	CCAGCAACACAAAUGUCCUTT (SEQ ID NO : 1475)	AGGACAUUUGUGUUGCUGGTT (SEQ ID NO : 1917)	1.1
RAG3A-249	CTCTGTGCTTCTTCCCCAG (SEQ ID NO : 1034)	CUCUGUCUUCUCCCCAGTT (SEQ ID NO : 1476)	CUGGGGAAGAAGCACAGAGTT (SEQ ID NO : 1918)	1.1
RAG3A-775	AGCCAGGGCCAAAGGAAA (SEQ ID NO : 1035)	AGCCAGGGCCAAAGGAAAATT (SEQ ID NO : 1477)	UUUCCUUUGGCCCUUGGCUTT (SEQ ID NO : 1919)	1.1

RAG3A-951	CCAGGATCTAGGCCACACT (SEQ ID NO : 1036)	CCAGGAUCUAGGCCACACUTT (SEQ ID NO : 1478)	AGUGUGGCCUAGAUCUCCUGGTT (SEQ ID NO : 1920)	1.1
RAG3A-861	GATGATGGGATCAAGGTCA (SEQ ID NO : 1037)	GAUGAUGGGAUCAAGGUCATT (SEQ ID NO : 1479)	UGACCUUGAUCCCAUCAUCTT (SEQ ID NO : 1921)	1.1
RAG3A-259	TAAACAAGACCTCTGTGCT (SEQ ID NO : 1038)	UAAACAAGACCUCUGUCUTT (SEQ ID NO : 1480)	AGCACAGAGGUCUUGUUUATT (SEQ ID NO : 1922)	1.1
RAG3A-394	ATGACAAGATAGGACTCCC (SEQ ID NO : 1039)	AUGACAAGAUAGGACUCCCTT (SEQ ID NO : 1481)	GGGAGUCCUAUCUUGUCAUTT (SEQ ID NO : 1923)	1.1
RAG3A-534	AGTGCACGTGTGCGCACAT (SEQ ID NO : 1040)	AGUGCACGUGUGCGCACAUTT (SEQ ID NO : 1482)	AUGUGCGCACACGUGCACUTT (SEQ ID NO : 1924)	1.1
RAG3A-316	TATGATGTCCAGGGAAG (SEQ ID NO : 1041)	UAUGAUGUCCAGGGAAGTT (SEQ ID NO : 1483)	CUUUUCCCUGGACAUCAUATT (SEQ ID NO : 1925)	1.1
RAG3A-560	CGAGCACCTAAGCTCAGGC (SEQ ID NO : 1042)	CGAGCACCUAAGCUCAGGCTT (SEQ ID NO : 1484)	GCCUGAGCUUAGGUGCUCGTT (SEQ ID NO : 1926)	1.1
RAG3A-1105	CCCACTCCCAGCCTCCTTT (SEQ ID NO : 1043)	CCCACUCCAGCCUCCUUUTT (SEQ ID NO : 1485)	AAAGGAGGCUGGGAGUGGGTT (SEQ ID NO : 1927)	1.1
RAG3A-709	TTCTTAAGACAGGGACACA (SEQ ID NO : 1044)	UUCCUAAGACAGGGACACATT (SEQ ID NO : 1486)	UGUGUCCCUGUCUUAAGGAATT (SEQ ID NO : 1928)	1.1
RAG3A-948	GGATCTAGGCCACACTTCT (SEQ ID NO : 1045)	GGAUCUAGGCCACACUUCUTT (SEQ ID NO : 1487)	AGAAGUGUGGCCUAGAUCCTT (SEQ ID NO : 1929)	1.1
RAG3A-998	TCCTTCCTAATCTTGGGAG (SEQ ID NO : 1046)	UCCUCCUAUUCUUGGGAGTT (SEQ ID NO : 1488)	CUCCCAAGAUUAGGAAGGATT (SEQ ID NO : 1930)	1.1
RAG3A-387	GATAGGACTCCCTAGGGGA (SEQ ID NO : 1047)	GAUAGGACUCCCUAGGGGATT (SEQ ID NO : 1489)	UCCCCUAGGGAGUCCUCAUCTT (SEQ ID NO : 1931)	1.1

【0174】 對 833 個 saRNA 的活性按照其在 *THPO* 啟動子上的位置排列，很明顯地看到功能性 saRNA 的分佈呈現聚集現象，即在某些啟動子區域，激活性 saRNA 聚集在特定的「熱點（hot spot）」區域（圖 11）。如圖 11 所示，在啟動子的-1339/-1044 區域（H1）、-1027/-903 區域（H2）、-861/-754 區域（H3）、-728/-611 區域（H4）和-593/-1（H5）分別出現 5 個熱點區域，表現為激活性 saRNA 的高度聚集。該分析結果表明，激活性 saRNA 在啟動子上並非隨機分佈，而是存在特定的熱點區域。

【0175】 熱點 H1（5'至 3'：-1339 至-1044）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:601 從 5'至 3'的位置 1 至位置 296：

```
1 caaacctca ccacctctc tctgccta gctgcctcc ctaccttctc
51 tctgaggtcg ctctcattc ttgtgtacc caggacaggg acctagccag
101 aaaccggcag cattccccct tctgtggagt gacagtatct ccctctcatt
151 gtaacttate ctgagcgca ttcgacagtc ccctcttgct ttctacccc
201 ctctcttcac ccaagggacc ctctgcctct ccagcccact cccagcctcc
251 ttctcttgg ttccctggtc atgctgcct cctgtctcc tgtctc
```

【0176】 熱點 H2（5'至 3'：-1027 至-903）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:602 從 5'至 3'的位置 1 至位置 125：

```
1 ccactatcct cccagctatc ccagcacct ccttctaatt ctgggagac
51 atctcgtctg gctggacggg aaaattccag gatctaggcc acattctca
101 gcagacatgc ccctccttgg ggagg
```

【0177】 熱點 H3（5'至 3'：-861 至-754）序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:603 從 5'至 3'的位置 1 至位置 108：

```
1 gatgatggga tcaaggtcag gccaggaagc ccctgaggac agagactgtg
51 gggagactgg gactgggaag aaagcaaagg agctagagcc agggccaaag
101 gaaaagg
```

【0178】 熱點 H4 (5'至 3' : -728 至-611) 序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:604 從 5'至 3'的位置 1 至位置 118：

1 ggaggtccag cagctgtctt tcctaagaca gggacacatg ggcctggta
51 ttcctcttgt cacatgtgga acggtaggag atggaagacg gagacagaac
101 aagcaaagga gggccctg

【0179】 熱點 H5 (5'至 3' : -593 至-1) 序列，其對應於序列表中 SEQ ID NO:605 從 5'至 3'的位置 1 至位置 593：

1 gtgtagccat ctaagccact ggaccccagc agacgagcac ctaagctcag
51 gcttaacca gtgcacgtgt gcgcacatac atgtgccccg cacctgacag
101 tccactcaac cegtccaaac cctttcccca taacaccaac ccataacagg
151 agatttctct catgtgggca atatccgtgt tcccacttcg aaagggggaa
201 tgacaagata ggactcccta ggggattaca gaaagaaaag caggaaagca
251 agcatcctgt tggatttcag cagcaggtat gatgtccagg gaaaagaaat
301 ttggatagcc agggagtga aaccccacca atcttaaaca agacctctgt
351 gcttcttccc cagcaacaca aatgtcctgc cagattcctc ctggaaaaaa
401 acttctgctc ctgtccccct ccaggtccca ggttgcccat gtccaggaaa
451 agatggatcc ccctatcaa atcttctccg tgggtgtgtgt ggggtggagga
501 gtggaccctg gtccaggcag gggctccagg gaagagaagg cgtcacttcc
551 gggggccttc accagtgtct ggtggctccc ttctctgatt ggg

【0180】 實施例 10. 人類 *THPO* saRNA 促進人類肝癌細胞 (HepG2) *THPO* mRNA 的表現

【0181】 (1) 細胞培養和轉染

【0182】 細胞培養如實施例 9 所述，HepG2 細胞（購自中國科學院上海生命科學研究院，TCHu119）以每孔 2×10^5 個鋪板到六孔板中，依照製造商的說明，使用 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 25 nM（除非另有說明）濃度轉染人類 *THPO* saRNA，轉染時間為 72 小時，每種處理使用 2 個複孔。。

【0183】 (2) 二步驟法 RT-qPCR

【0184】 轉染結束後，棄掉培養基，每孔加入 500 μl 細胞裂解液，室溫孵育 5 分鐘。用 Qiagen RNeasy 套組提取 RNA，反轉錄後在 ABI 7500 快速即時 (Fast Real-time) PCR 系統 (Applied Biosystems) 進行 qPCR 分析，每個樣本重複 3 個複孔擴增，RT-PCR 和 qPCR 反應體系如實施例 5 中的表 5 和表 6 所示，擴增引子見表 11。同時擴增 *TBP* 和 *HPRT1* 基因作為內部參考，其中 *THPO* 用 *THPO* F1/R1 引子對擴增。

【0185】 反應條件為：95℃ 30 秒，95℃ 5 秒，60℃ 30 秒，擴增 40 個循環。

【0186】 為了計算某個 saRNA 轉染樣本的 *THPO* (目的基因) 的相對於對照處理 (Mock) 的表現值 (E_{rel})，用實施例 3 中的公式 2 代入目的基因及 2 個內部參考基因的 Ct 值計算。

$$E_{rel} = 2^{(Ct_{Tm}-Ct_{Ts})} / 2^{(Ct_{Rm}-Ct_{Rs})} \quad (\text{公式 2})$$

【0187】 圖 12 所示為不同 saRNA 處理後細胞中的 *THPO* 相對 mRNA 的表現值。以對照處理 (Mock) 作為空白轉染對照，與對照組相比，siRNA (RAG3A-365i) 組的 mRNA 相對表現值敲低了 85%，這說明 siRNA 作為短小干擾 RNA 對照轉染是成功的。RAG3A-1219、RAG3A-1096、RAG3A-1308、RAG3A-1069 和 RAG3A-851 組的 mRNA 相對表現值均高於對照組，其 mRNA 相對表現值分別上升了 1.8、1.8、1.6、1.7 和 1.9 倍。RAG3A-541、RAG3A-1319、RAG3A-62、RAG3A-889 和 RAG3A-787 組的 mRNA 相對表現值也高於對照組，分別增加了 2.5、2.1、2.9、2.0 和 2.0 倍。RAG3A-62 的激活效果尤為明顯，其 mRNA 相對表現值增加了近 3 倍。這說明隨機選擇的激活性 saRNA 不僅能夠被成功轉染到在 HepG2 細胞中，而且能夠顯著地增加 *THPO* mRNA 的表現。

【0188】 實施例 11. 人類 *THPO* saRNA 促進人類肝癌細胞

(HepG2) THPO 蛋白水平的表現

【0189】 細胞培養如實施例 9 所述，細胞轉染如實施例 10 所述。使用 ELISA 套組檢測 HepG2 細胞培養液中 THPO 蛋白水平

1) 用去離子水或蒸餾水溶解人類 THPO 蛋白標準品。溶解產生 20,000 pg/mL 蛋白標準品的儲備溶液。取 100 μ L THPO 蛋白標準品儲備液加入 900 μ L 校準稀釋劑 RD6-11 (稀釋 1:5) (用於細胞培養上清樣品) 或校準稀釋劑 RD6-11 (用於血清/血漿樣品) 得到 2000 pg/mL 的標準品溶液，在此基礎上 7 個梯度稀釋，適當的校準稀釋劑作為零標準 (0 pg/mL)。

2) 取樣品的細胞上清液，離心去掉死細胞和碎片。

3) 從微孔板框上取出適量的微孔板帶。

4) 每孔加入 50 μ L 的分析稀釋劑 RD1-1。

5) 每孔加入 200 μ L 的標準品、對照或者處理樣品。蓋上膜，室溫孵育 3h。

6) 去掉每個孔的液體隨後用 400 μ L 洗滌緩衝液清洗 4 次。

7) 每孔加入 200 μ L 的人類 THPO 抗體蓋上膜室溫孵育 1 小時。

8) 重複步驟 5。

9) 每孔加入 200 μ L 受質溶液 (顯色試劑 (Color Regent) A 和 B 等體積混合，15 分鐘之內使用完) 室溫避光孵育 30 分鐘。

10) 每孔加入 50 μ L 終止液，輕輕混勻。

11) 使用多功能酶標儀檢測 450 nm 處的吸光度 (30 分鐘之內)。

【0190】 圖 13 所示為不同 saRNA 處理後細胞培養液中 THPO 相對蛋白水平的表現值。以對照處理 (Mock) 作為空白轉染對照，與對照組相比，siRNA (DS3A-365i) 組的蛋白相對表現值敲低了 81%，這說明 siRNA 作為短小干擾 RNA 對照轉染是成功的。RAG3A-723、RAG3A-892、RAG3A-62、RAG3A-1178、RAG3A-889、RAG3A-563、RAG3A-487 和 RAG3A-787 組的 THPO 蛋白水平相對表現值均高於對照組，其蛋白水平相對表現值分別上升了 1.46、1.26、1.44、1.31、1.29、1.32、1.42 和 1.40 倍。這說明隨機選擇的激活性 saRNA 在 HepG2

細胞中能夠不同程度地促進 THPO 蛋白水平的表現。

【0191】 綜合上述結果，申請人藉由高通量分別篩選靶向人類和小鼠 *THPO/Thpo* 基因啟動子的 saRNA，發現了多個能夠顯著激活 *THPO/Thpo* 基因表現的人類和小鼠的 saRNA。申請人藉由大量研究發現，小鼠的靶向其 *Thpo* 基因的活性 saRNA 和人類的靶向其 *THPO* 基因的活性 saRNA 均可以被本發明中使用的脂質體系統有效遞送至細胞內，並且能夠在 mRNA 和蛋白表現層面顯著上調細胞內 *Thpo/THPO* 基因和蛋白質的表現。特別是小鼠 *Thpo* 基因的活性 saRNA，其在小鼠體內顯著增加 *Thpo* mRNA 和蛋白的表現，並同時顯著上調或增加血小板的數量。因此，本發明的小鼠 *Thpo* 活性 saRNA 和人類 *THPO* 活性 saRNA 可用於治療由 *Thpo/THPO* 蛋白表現下降或者不足引發的疾病或病症或由各種原因引起疾病或狀況，如血小板減少症，或製備用於治療上述疾病或病症的藥物。

【0192】 參考文獻

Bartley, T. D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y. S. Li, H. S. Lu, F. Martin, M. S. Chang, B. Samal, J. L. Nichol, S. Swift, and et al. 1994. 'Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl', *Cell*, 77: 1117-24.

Basser, R. 2002. 'The impact of thrombopoietin on clinical practice', *Curr Pharm Des*, 8: 369-77.

de Sauvage, F. J., P. E. Hass, S. D. Spencer, B. E. Malloy, A. L. Gurney, S. A. Spencer, W. C. Darbonne, W. J. Henzel, S. C. Wong, W. J. Kuang, and et al. 1994. 'Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand', *Nature*, 369: 533-8.

Hassan, M. N., and E. K. Waller. 2015. 'Treating chemotherapy-induced thrombocytopenia: is it time for oncologists

to use thrombopoietin agonists?', *Oncology (Williston Park)*, 29: 295-6.

Kaushansky, K. 2006. 'Lineage-specific hematopoietic growth factors', *N Engl J Med*, 354: 2034-45.

Kuter, D. J. 2009. 'Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia', *Annu Rev Med*, 60: 193-206.

Laki, K. 1972. 'Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences', *Ann N Y Acad Sci*, 202: 297-307.

Machlus, K. R., J. N. Thon, and J. E. Italiano, Jr. 2014. 'Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation', *Br J Haematol*, 165: 227-36.

Mignotte, V., I. Vigon, E. Boucher de Crevecoeur, P. H. Romeo, V. Lemarchandel, and S. Chretien. 1994. 'Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL)', *Genomics*, 20: 5-12.

Provan, D., R. Stasi, A. C. Newland, V. S. Blanchette, P. Bolton-Maggs, J. B. Bussel, B. H. Chong, D. B. Cines, T. B. Gernsheimer, B. Godeau, J. Grainger, I. Greer, B. J. Hunt, P. A. Imbach, G. Lyons, R. McMillan, F. Rodeghiero, M. A. Sanz, M. Tarantino, S. Watson, J. Young, and D. J. Kuter. 2010. 'International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia', *Blood*, 115: 168-86.

Seo, A., M. Ben-Harosh, M. Sirin, J. Stein, O. Dgany, J. Kaplelushnik, M. Hoenig, U. Pannicke, M. Lorenz, K. Schwarz, C. Stockklausner, T. Walsh, S. Gulsuner, M. K. Lee, A. Sendamarai, M. Sanchez-Bonilla, M. C. King, H. Cario, A. E. Kulozik, K. M. Debatin, A. Schulz, H. Tamary, and A. Shimamura. 2017. 'Bone

marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in thrombopoietin', *Blood*, 130: 875-80.

Solberg, L. A., Jr. 2005. 'Biologic aspects of thrombopoietins and the development of therapeutic agents', *Curr Hematol Rep*, 4: 423-8.

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種治療個體中血小板減少症和/或與 *THPO* 蛋白表現不足或減少相關的疾病或狀況的方法，包括給該個體施用治療有效量的針對 *THPO* 啟動子的小型活化核酸分子、表現該小型活化核酸分子的核酸分子、包含該小型活化核酸分子的組成物或製劑。

【請求項2】 如請求項 1 所述的方法，其中該血小板減少症包括各種原因所致的血小板減少症，例如先天性（遺傳性）和獲得性血小板減少症，較佳地，包括骨髓生成血小板減少、周邊血液血小板破壞增加及脾臟扣留血小板。

【請求項3】 如請求項 1 所述的方法，其中該血小板減少症包括但不限於與 *THPO* 蛋白表現不足或減少相關的血小板減少症、各種其他因素導致的血小板減少症，如免疫性血小板減少症、藥物源性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫癜、遺傳性血小板減少症等。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的方法，其中該個體是哺乳動物。

【請求項5】 如請求項 4 所述的方法，其中該個體是人類。

【請求項6】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的方法，其中該小型活化核酸分子包含第一核酸鏈和第二核酸鏈，第一核酸鏈與 SEQ ID NO: 601 至 SEQ ID NO:605 中的任一個的連續 16-35 個核苷酸具有至少 75%的同源性或互補性，例如至少約 79%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%、或約 100%的同源性或互補性，第一核酸鏈和第二核酸鏈能藉由互補形成雙股核酸結構，雙股核酸結構能夠激活 *THPO* 基因在細胞中的表現。

【請求項7】 如請求項 6 所述的方法，其中該小型活化核酸分子的第一核酸鏈可以包括或選自 SEQ ID NO: 1048 至 SEQ ID NO: 1489 中的任一核苷酸序列，並且其第二鏈可以包括或選自 SEQ ID NO:1490 至 SEQ ID NO: 1931 中的任一核苷酸序列。

【請求項8】 如請求項 6 所述的方法，其中該第一核酸鏈和該第二核酸鏈存在於兩條不同的核酸鏈上。

【請求項9】 如請求項 6 所述的方法，其中該第一核酸鏈和該第二核酸鏈存在於同一條核酸鏈上，較佳地，該小型活化核酸分子為髮夾型單股核酸分子，其中該第一核酸鏈和該第二核酸鏈包含形成雙股核酸結構的互補區域。

【請求項10】 如請求項 1 所述的方法，其特徵在於該小型活化核酸分子的至少一條鏈在 3'端具有 0 至 6 個核苷酸的突出。

【請求項11】 如請求項 10 所述的方法，其特徵在於該小型活化核酸分子的兩條鏈在 3'端都具有 0 至 6 個核苷酸的突出，較佳地具有 2 個或 3 個核苷酸的突出。

【請求項12】 如請求項 6 或 7 所述的方法，其特徵在於該第一核酸鏈和該第二核酸鏈的長度分別為 16 至 35 個核苷酸。

【請求項13】 如請求項 1 至 12 中任一項所述的方法，其中該小型活化核酸分子包括至少一個修飾，較佳地，該修飾為化學修飾。

【請求項14】 如請求項 13 所述的方法，其中該化學修飾包括或選自如下修飾中的一種或多種：

- (1) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中連接核苷酸的磷酸二酯鍵的修飾；
- (2) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的核糖的 2'-OH 的修飾；
- (3) 對該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的鹼基的修飾；
- (4) 該小型活化核酸分子的核苷酸序列中的至少一個核苷酸為鎖核酸。

【請求項15】 如請求項 13 所述的方法，其中該化學修飾包括或選自如下修飾中的一種或多種：2'-氟代修飾、2'-氧甲基修飾、2'-氧亞乙基甲氧基修飾、2,4'-二硝基苯酚修飾、鎖核酸 (LNA)、2'-胺基修飾、2'-脫氧修飾、5'-溴尿嘧啶修飾、5'-碘尿嘧啶修飾、N-甲基尿嘧啶修飾、2,6-二胺基嘌呤修飾、硫代磷酸修飾和硼烷化磷酸鹽修飾。

【請求項16】 如請求項 3 所述的方法，其中該獲得性血小板減少症包括但不限於再生障礙性貧血、骨髓增生異常綜合症、白血病、藥物、感染、腫瘤疾病、放療、骨髓移植、慢性肝臟疾病等引起的血小板減少，免疫性血小板減少症，其中導致周邊血液血小板破壞增加的因素有血栓性血小板減少、肝素誘發的血小板減少、藥源性血小板減少、ITP 及血栓性血小板減少性紫癜。

【請求項17】 一種激活或者上調 *THPO* 基因在個體或細胞中的表現的方法，其中該方法包括給該個體或細胞施用本發明所述的小型活化核酸分子、編碼本發明的小型活化核酸分子的核酸、或包含本發明的小型活化核酸分子的組成物或製劑。

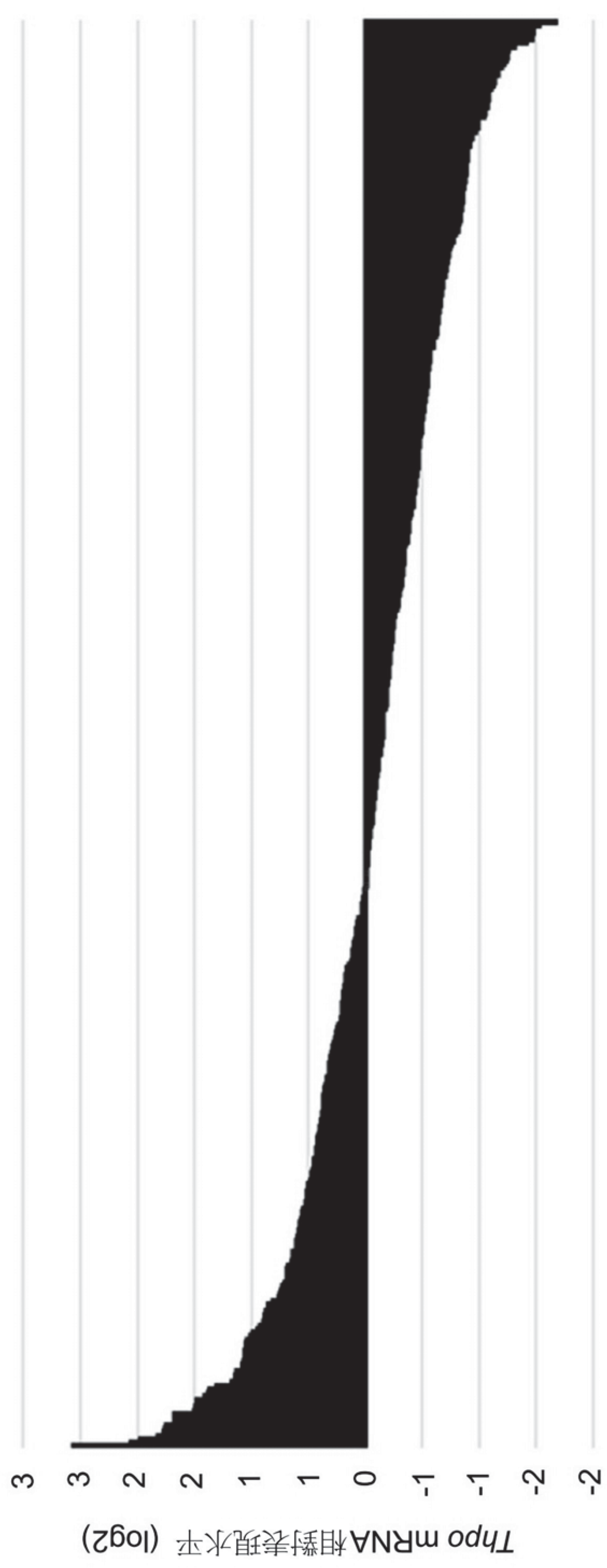
【請求項18】 一種編碼如請求項 1 至 9 中任一項所述的小型活化核酸分子的核酸。

【請求項19】 一種包含如請求項 1 至 9 中任一項所述的小型活化核酸分子或編碼請求項 1 至 9 中任一項所述的小型活化核酸分子的核酸的細胞。

【請求項20】 一種包含如請求項 1 至 9 中任一項所述的小型活化核酸分子的組成物。

【請求項21】 一種包含如請求項 1 至 9 中任一項所述的小型活化核酸分子的製劑，其中該製劑包含脂質體，較佳地，該製劑包括 LNP 包載的小型活化核酸分子。

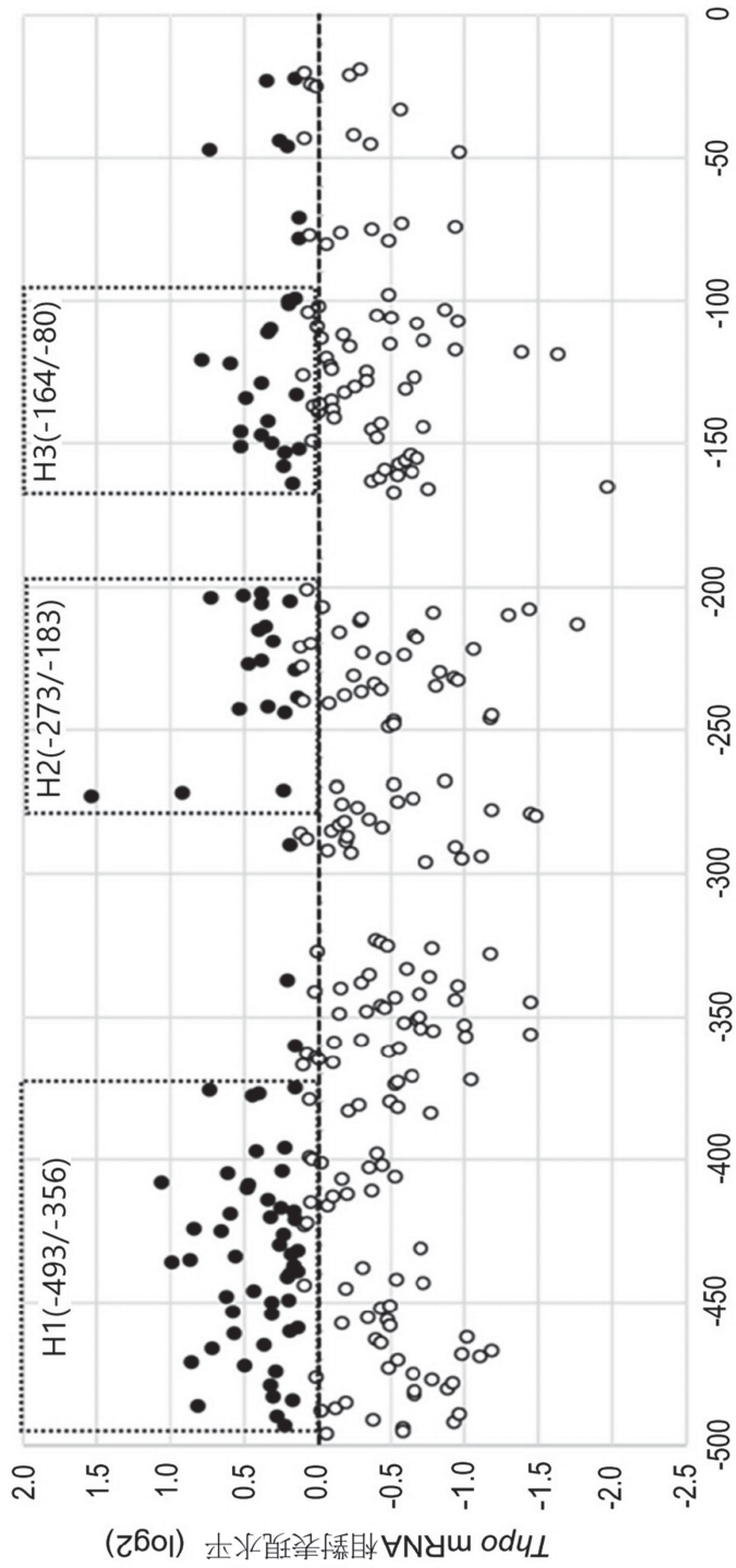
【發明圖式】



SaRNA(按照活性排序, n=322)

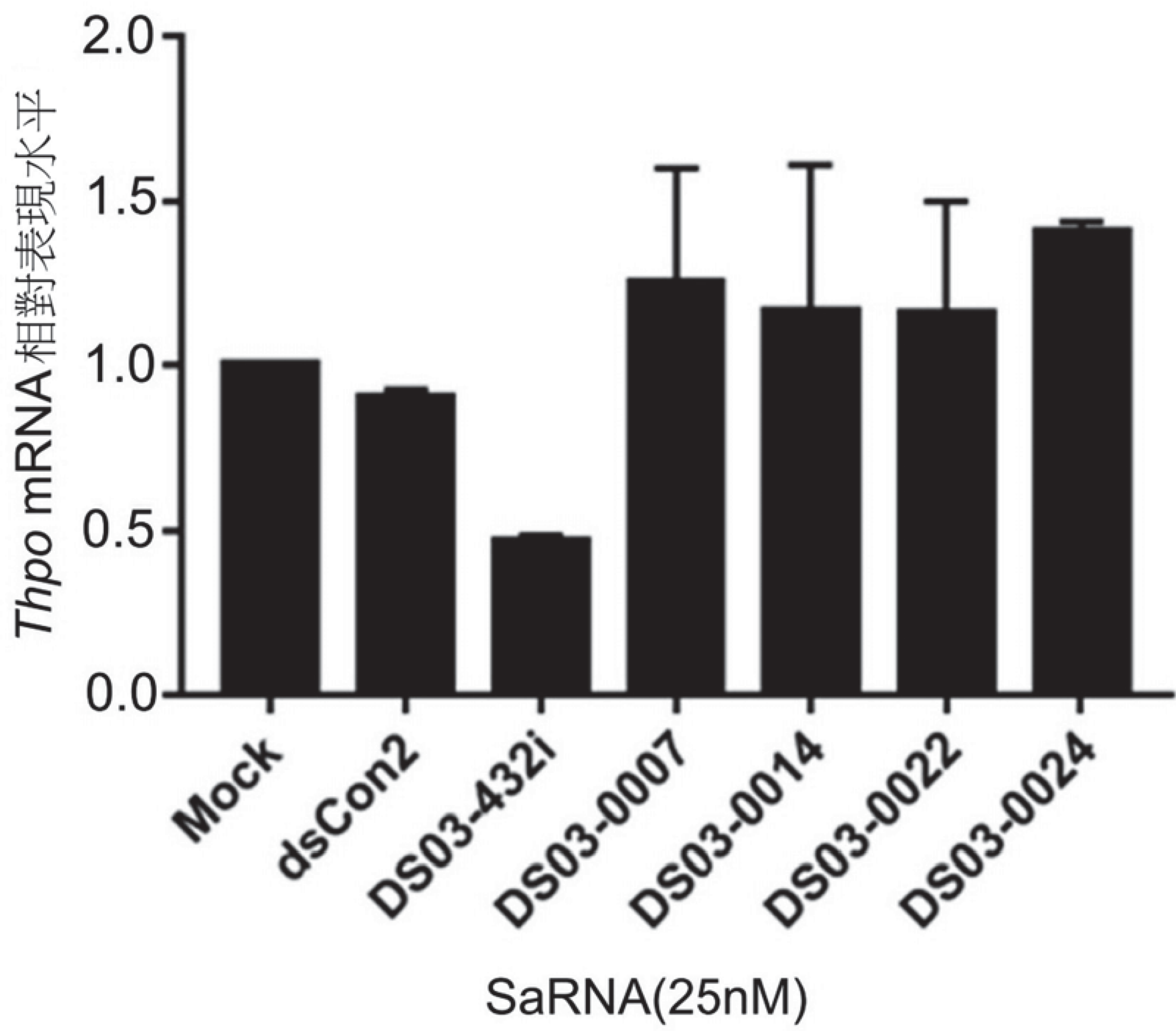
【圖1】

● 功能性SaRNA ○ 非功能性SaRNA

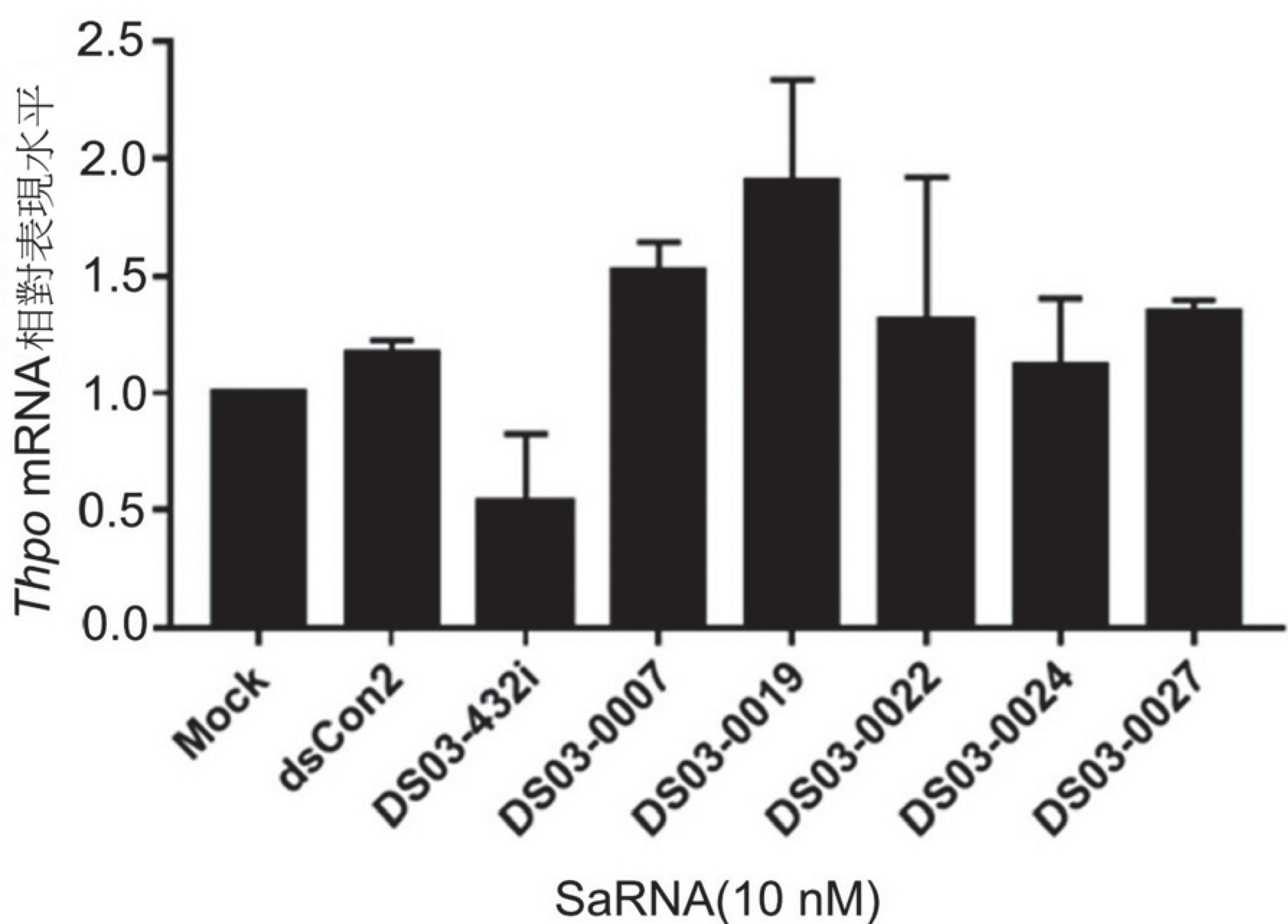


SaRNA(按照位置排序 , n=322)

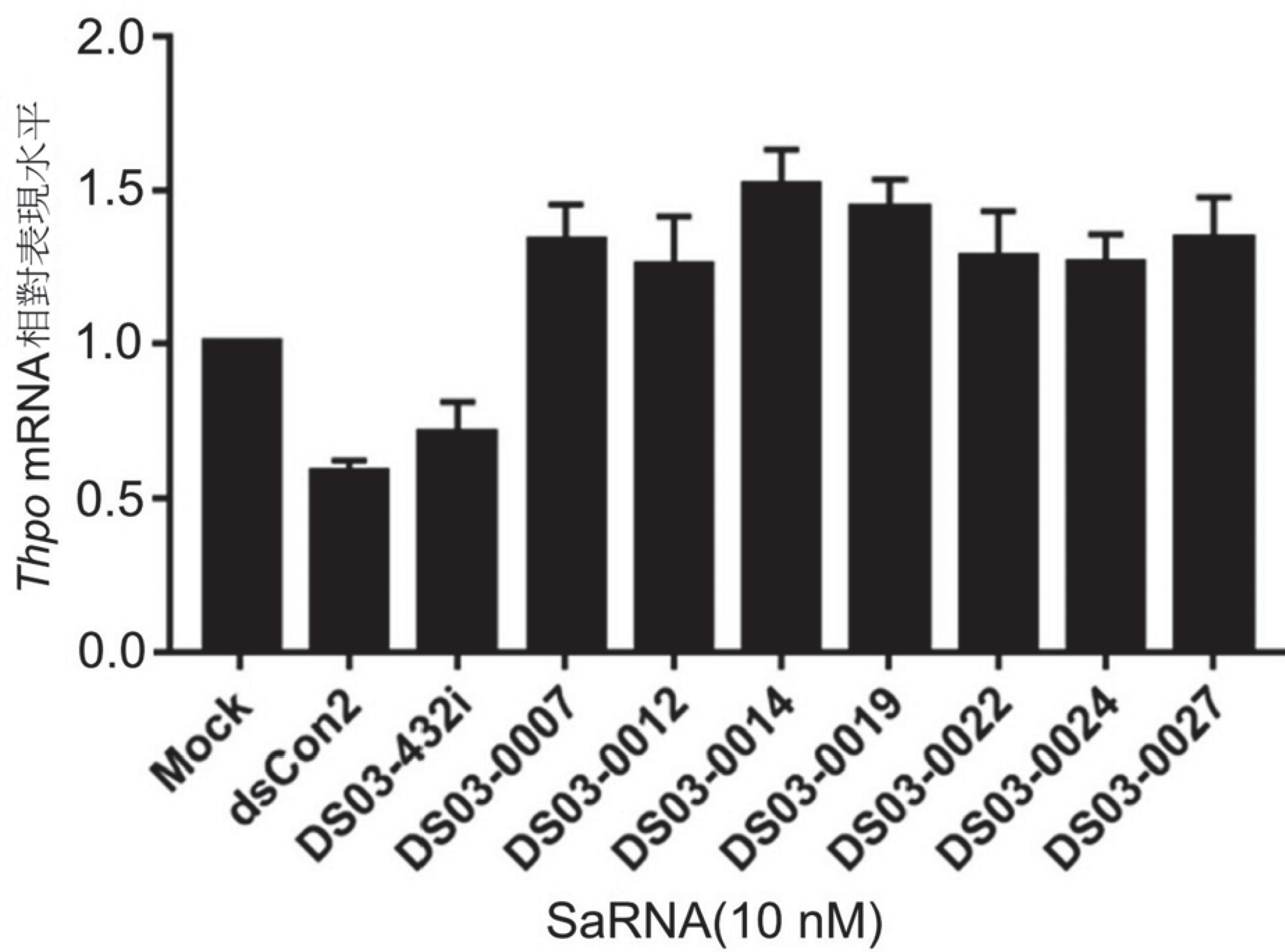
【圖2】



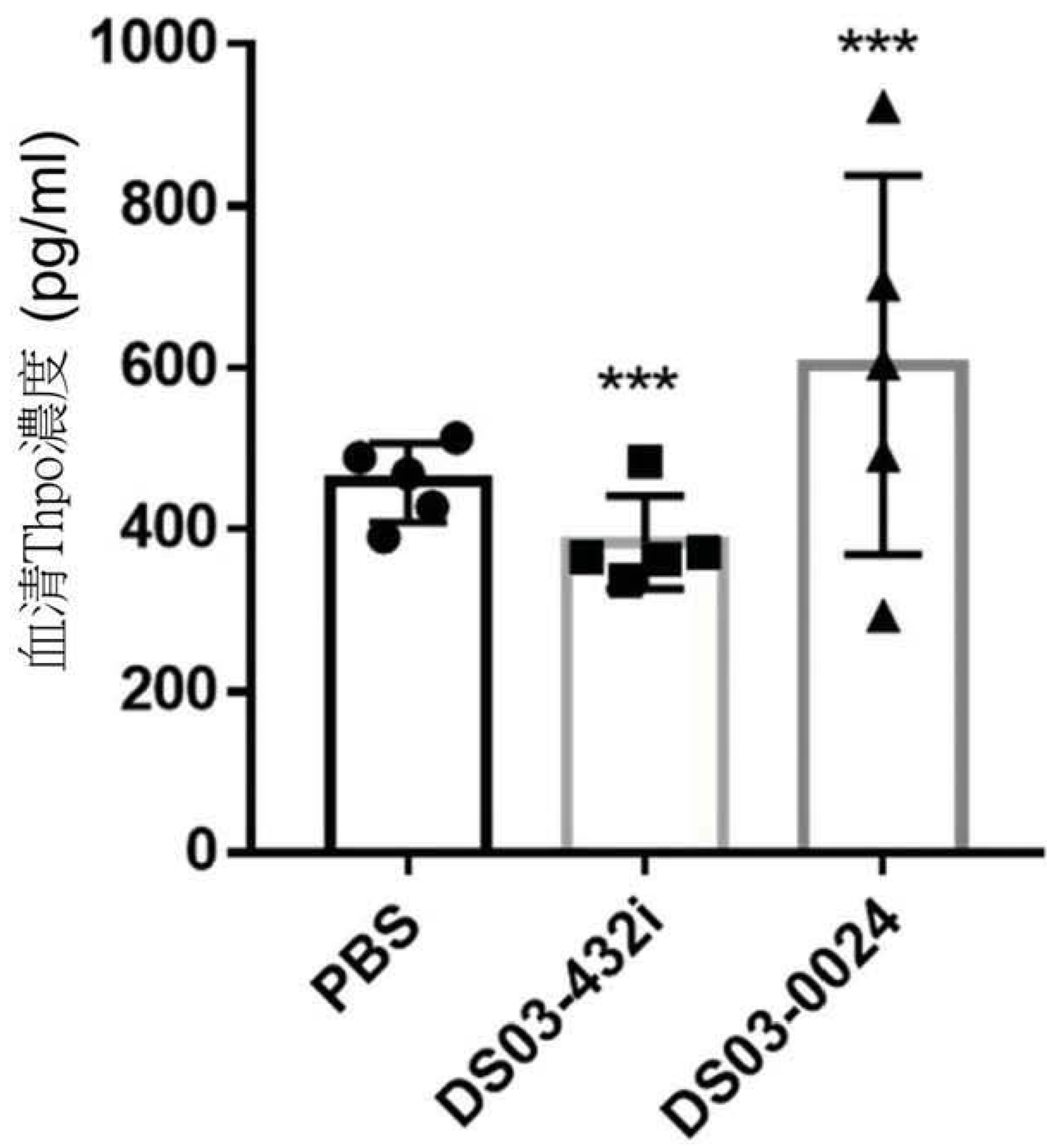
【圖3】



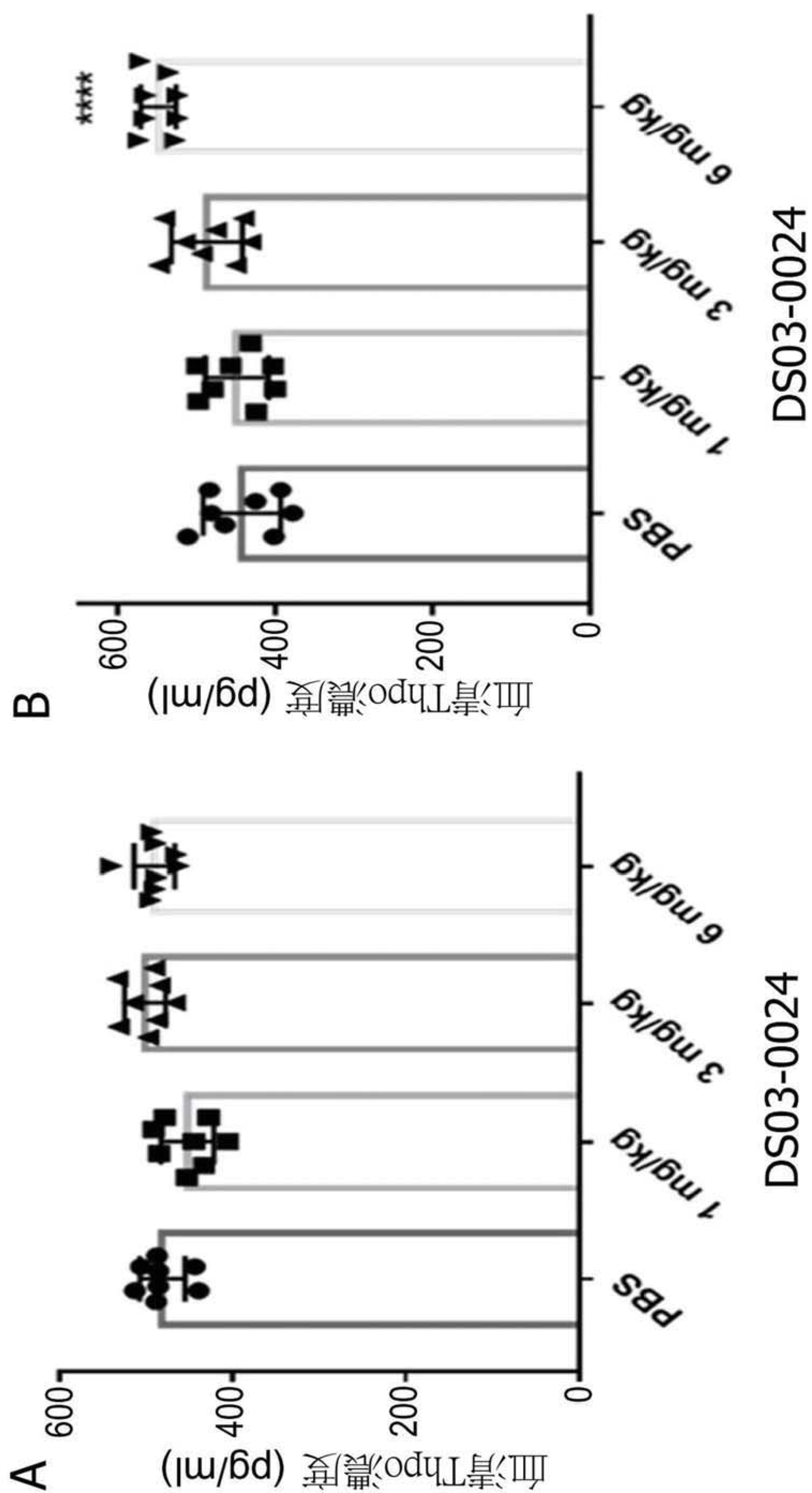
【圖4】



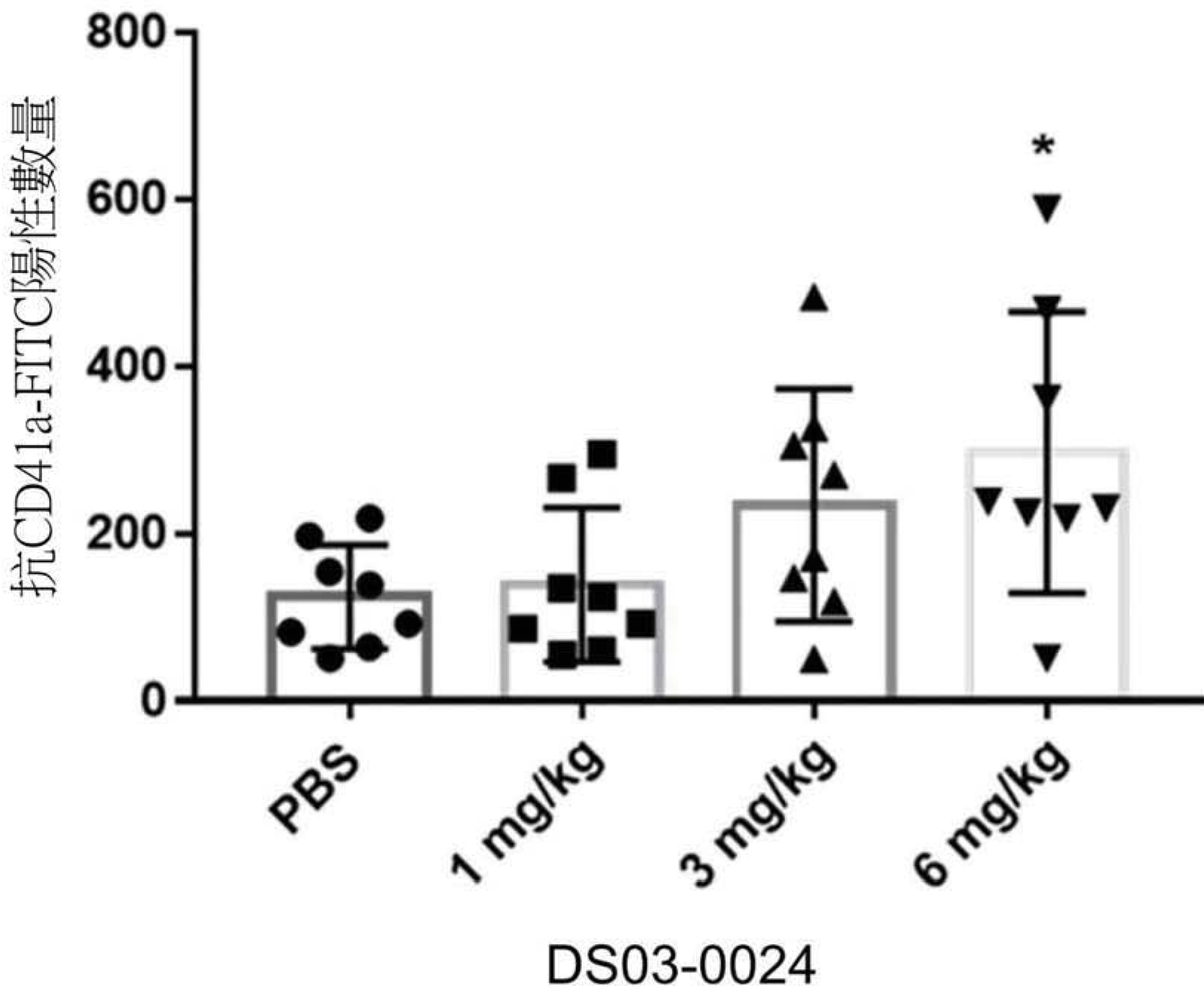
【圖5】



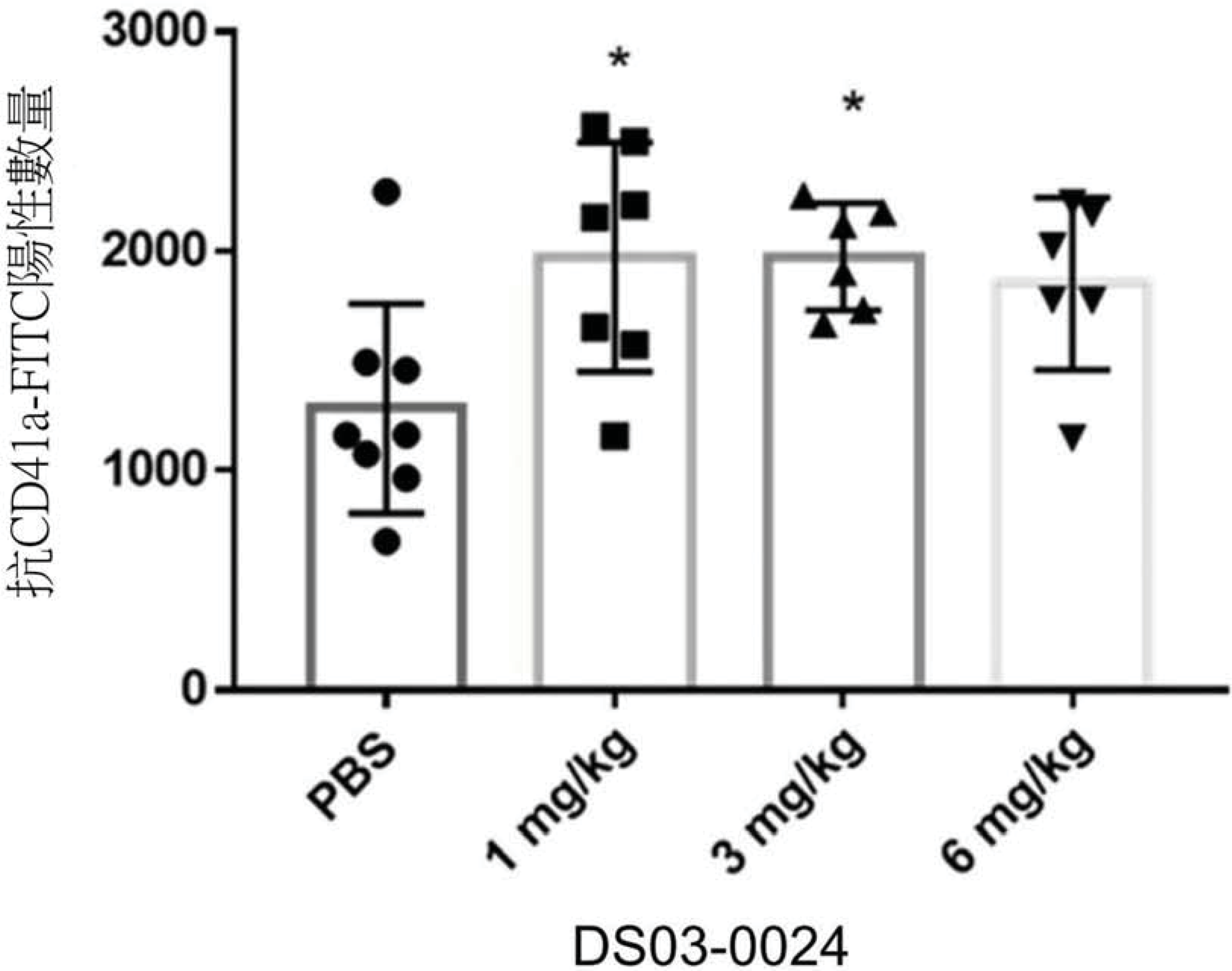
【圖6】



【7回】



【圖8】

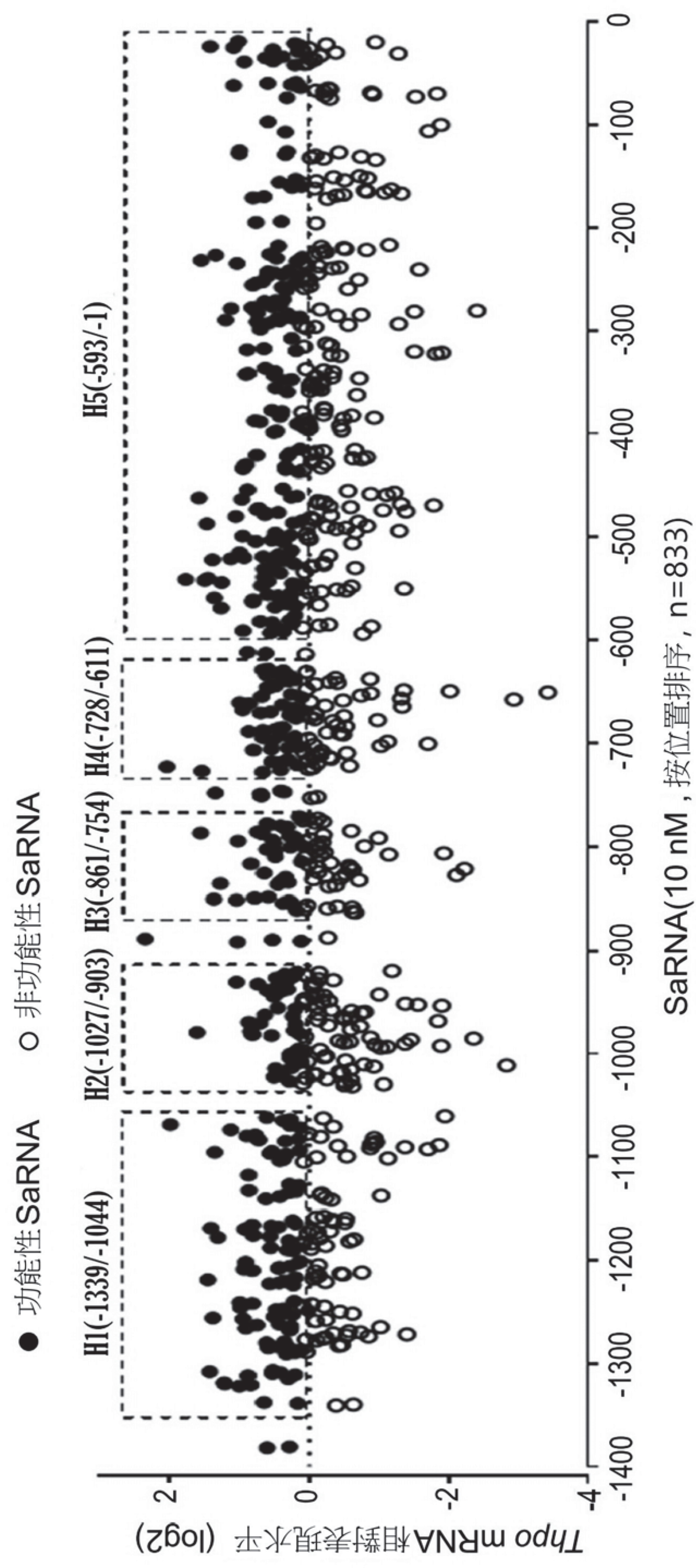


【圖9】

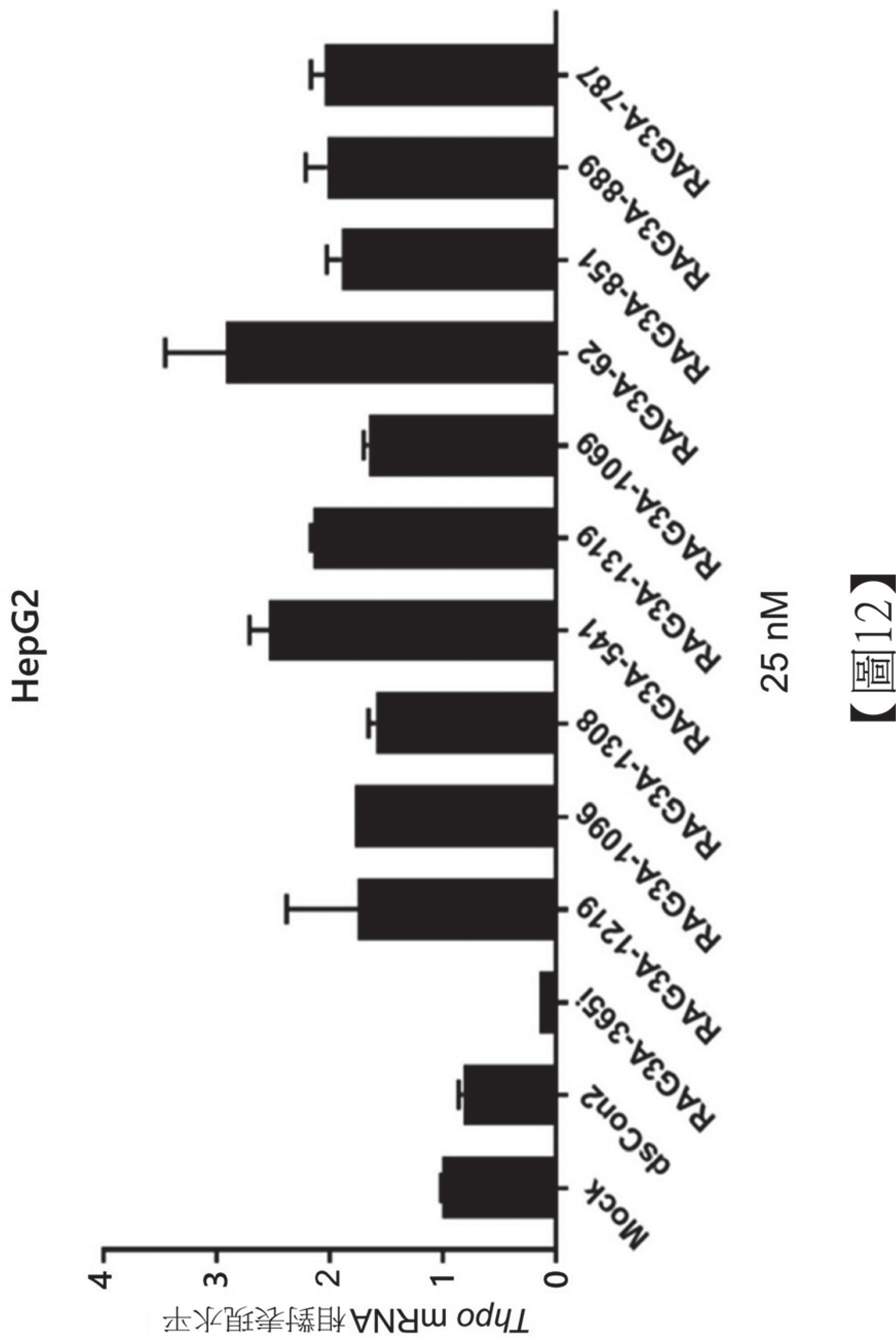


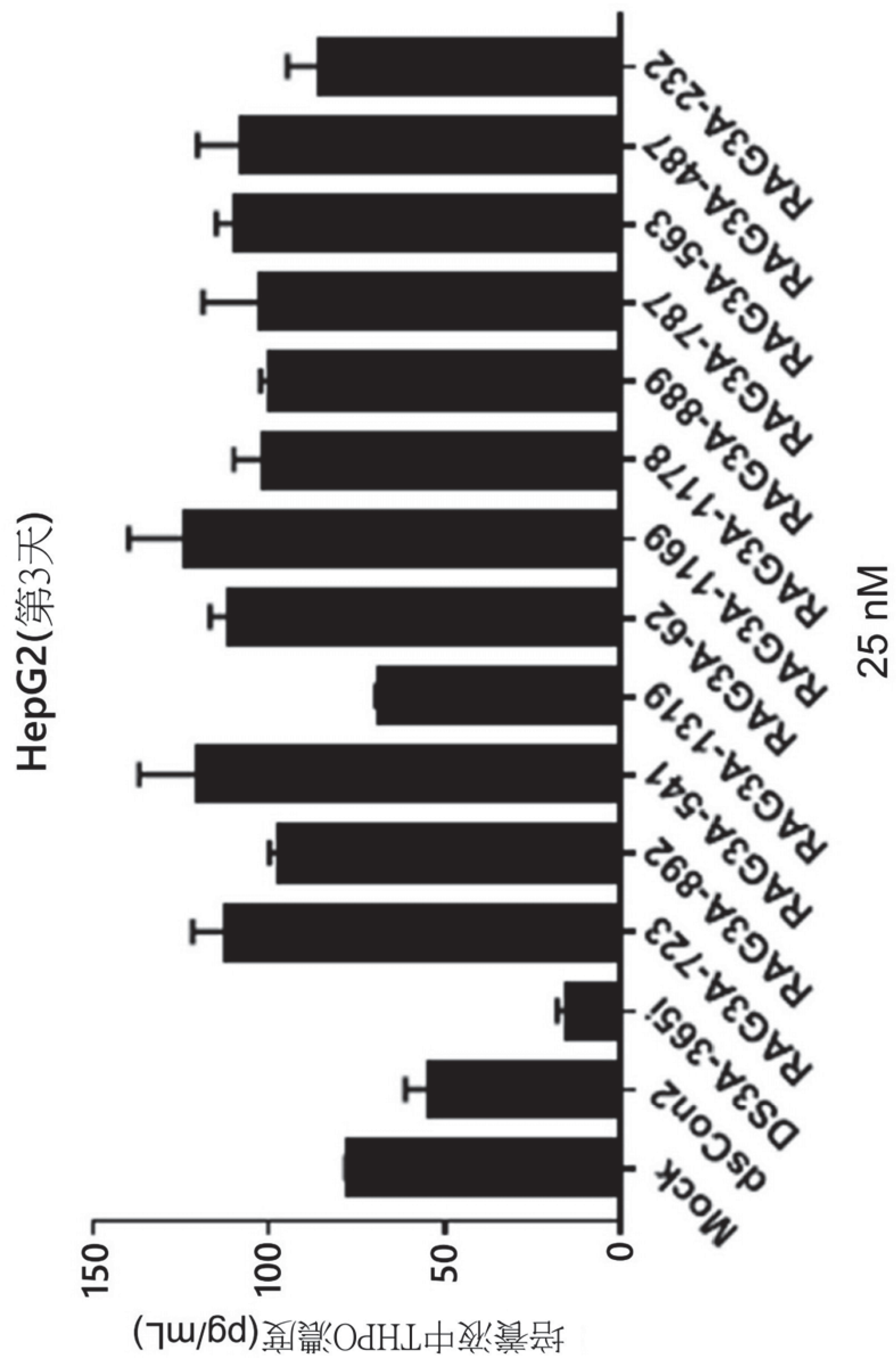
25 nM
SaRNA(按照位置排序, n=833)

【圖10】



【圖11】





【圖13】

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於治療血小板減少症的核酸分子及其應用

【英文發明名稱】NUCLEIC ACID MOLECULE FOR TREATMENT OF
THROMBOCYTOPENIA AND THE APPLICATION
THEREOF

【中文】

本發明涉及小型活化核酸分子以及其在與THPO蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況如血小板減少症治療中的應用。本案提供基於RNA激活機制的小型活化核酸分子，其可以是靶向*Thpo/THPO*基因啟動子區的雙股或單股RNA分子，包含第一核酸鏈和第二核酸鏈。靶向*Thpo/THPO*基因啟動子區的雙股RNA分子包含兩條長度為16-35個核苷酸的核酸鏈，並且其中一條核酸鏈與選自*Thpo/THPO*基因啟動子區的靶點存在至少75%的同源性或互補性。本發明也涉及包含該小型活化核酸分子的醫藥組成物或製劑；使用該小型活化核酸分子以及使用該醫藥組成物或製劑可以上調*Thpo/THPO*基因在細胞中的表現以及治療與THPO蛋白質缺乏或不足相關的疾病或狀況或因各種原因引起的血小板減少症的方法。

【英文】

The present invention provides a small activating nucleic acid molecule and its application in the treatment of diseases or conditions related to THPO protein deficiency, such as thrombocytopenia. Based on RNA activation mechanism, the small activating nucleic acid molecule can be a double-stranded or single-stranded RNA molecule targeting the promoter region of *Thpo/THPO* gene, which comprises a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand. The double-stranded RNA molecule targeting *Thpo/THPO* gene promoter region comprises two nucleic acid strands with a length of 16-35 nucleotides, and one of the nucleic acid strands has at

least 75% homology or complementarity to the target selected from the promoter region of Thpo/THPO gene. The present invention also relates to a pharmaceutical composition or preparation comprising the small activating nucleic acid molecule. The small activating nucleic acid molecule and the pharmaceutical composition or preparation can be used to up-regulate the expression of Thpo/THPO gene in cells and treat diseases or conditions related to THPO protein deficiency or thrombocytopenia caused by various reasons.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無